

ACADEMIE DE MONTPELLIER

UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DU LANGUEDOC

T H E S E

présentée à l'Université des Sciences et Techniques du Languedoc
pour obtenir le grade de **DOCTEUR ES SCIENCES PHYSIQUES**

ETUDE DE L'HÉTÉROGÉNÉITÉ DE LA CHAÎNE α D'HÉMOGLOBINE
CHEZ LA SOURIS DE SOUCHE C3H ADULTE ET FOETALE.

MISE EN EVIDENCE D'UN FACTEUR SEMBLANT CONTROLER
L'HÉTÉROGÉNÉITÉ DE CETTE CHAÎNE α

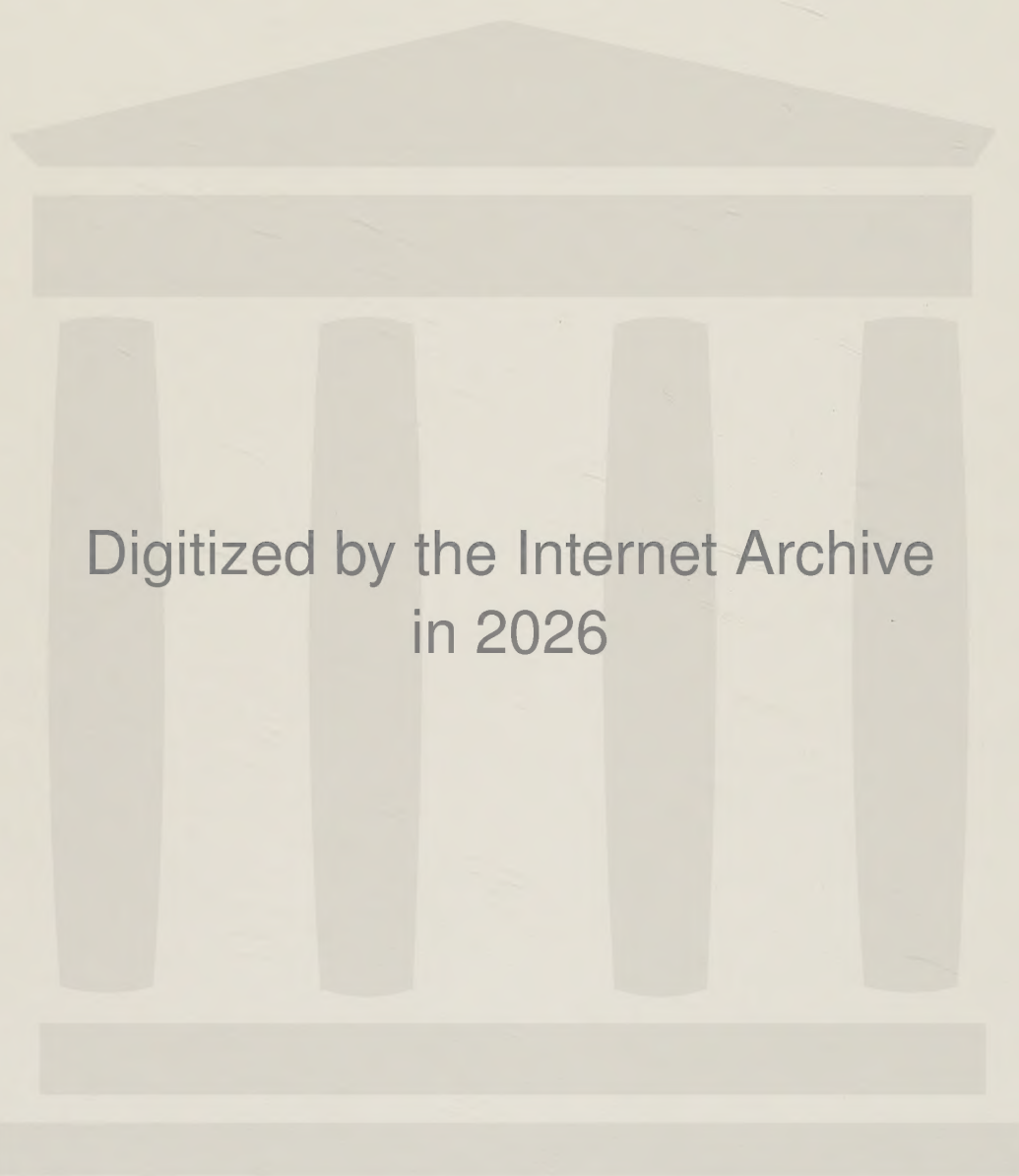
par

Arnaud DUPUY d'ANGEAC

Attaché de Recherches au C.N.R.S.

Soutenue le 6 Juin 1973 devant la Commission d'Examen.

JURY :	Mme	H. COLSON-GUASTALLA	Présidente
	M.	E. KAHANE	} Assesseurs
	M.	J. KRUH	
	M.	E. ZUCKERKANDL	
	M.	PH. JEANTEUR	



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548320_0012

ACADEMIE DE MONTPELLIER

UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DU LANGUEDOC

T H E S E

présentée à l'Université des Sciences et Techniques du Languedoc
pour obtenir le grade de **DOCTEUR ES SCIENCES PHYSIQUES**

ETUDE DE L'HÉTÉROGÉNÉITÉ DE LA CHAÎNE α D'HÉMOGLOBINE
CHEZ LA SOURIS DE SOUCHE C3H ADULTE ET FOETALE.

MISE EN EVIDENCE D'UN FACTEUR SEMBLANT CONTROLER
L'HÉTÉROGÉNÉITÉ DE CETTE CHAÎNE α

par

Arnaud DUPUY d'ANGEAC

Attaché de Recherches au C.N.R.S.

Soutenue le 6 Juin 1973 devant la Commission d'Examen.

JURY :	M ^{me}	H. COLSON-GUASTALLA	Présidente	
	M.	E. KAHANE		
	M.	J. KRUH		
	M.	E. ZUCKERKANDL		
	M.	PH. JEANTEUR		

} Assesseurs

UNIVERSITY OF TORONTO LIBRARY

STUDY OF THE HISTORY OF THE
CITY OF TORONTO
AND THE
UNIVERSITY OF TORONTO LIBRARY



UNIVERSITY OF TORONTO LIBRARY
100 St. George Street
Toronto, Ontario
M5S 1A5
Canada

L'exposé de ce travail est pour nous l'occasion d'exprimer notre reconnaissance à tous ceux qui nous ont permis sa réalisation.

Nous remercions Madame H. COLSON-GUASTALLA, Professeur, de l'honneur qu'elle nous fait en présidant cette thèse et de la bienveillance qu'elle a toujours montrée à notre égard.

Nos remerciements iront aussi à Monsieur le Professeur E. KAHANE, Monsieur le Professeur J. KRUH, Monsieur le Docteur Ph. JEANTEUR pour l'intérêt qu'ils ont porté à ce travail.

C'est Monsieur E. ZUCKERKANDL, Directeur du Département de Biochimie Macromoléculaire, qui a permis que le travail soit réalisé. Depuis de nombreuses années il nous a apporté une aide morale et matérielle pour la réalisation de cette thèse. Nous tenons tout particulièrement à le remercier en témoignage de son amitié.

Monsieur J.P. SALLEI a contribué pour une grande part à ce travail.

Nous remercions Messieurs Raoul BERTRAND, E. AUDEMARD, G. ROSEAU et P. PANTEL pour l'aide qu'ils nous ont apportée en effectuant de très nombreuses analyses.

LISTE DES PROFESSEURS
DE L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES
DU LANGUEDOC

PRESIDENT : J. ROUZAUD.

Vice-Présidents : B. CHARLES - G. SAUMADE.

Doyens honoraires de l'Université des Sciences et Techniques du Languedoc :

P. MATHIAS
B. CHARLES
A. CASADEVALL

Professeurs honoraires de l'Université des Sciences et Techniques du Languedoc :

R. JACQUES	G. DENIZOT	M. MOUSSERON
M. CASTERAS	J. GRANIER	P. CHATELAIN
E. CARRIERE	Ch. BOUHET	A.M. VERGNOUX
E. TURRIERE	J. MOTTE	J. SALVINIEN
	C. CAUQUIL	

Secrétaire Général : E. SIAU

Professeurs titulaires :

M.	J.P. ROIG	Physique
Mlle	O. TUZET	Zoologie
M.	G. COUCHET	Mécanique Supérieure
M.	J. AVIAS	Géologie
M.	P. VIELES	Chimie
M.	R. MAURY (I.P.A.)	Droit
M.	E. KAHANE	Chimie Biologique
M.	J.J. MOREAU	Mécanique Rationnelle

M.	B. CHARLES	Mathématiques Pures
M.	R. JOUTY	Physique
M.	R. LEGENDRE	Zoologie
M.	I. ASSENMACHER	Physiologie Animale
M.	B. PISTOULET	Physique
M.	Ch. ROUMIEU	Analyse Supérieure
M.	J. ROBIN	Physique
M.	A. POTIER	Chimie Minérale
M.	R. LAFONT	Physique
M.	R. JACQUIER	Chimie
M.	J. FALGUEIRETTES	Minéralogie
M.	J. REGNIER	Chimie
Mme	J. CHARLES	Mathématiques
M.	P. CAILLON	Physique
M.	J. ROUZAUD	Chimie
M.	Ch. SAUVAGE	Botanique
M.	H. CHRISTOL (E.N.S.I.).....	Chimie
Mme	G. VERNET	Biologie Animale
M.	L. CECCHI.....	Physique
M.	H. ANDRILLAT	Astronomie
M.	M. SAVELLI	Physique
M.	M. MATTAUER	Géologie
M.	L. EUZET	Zoologie
M.	C. DELOUPY	Physique
M.	L. GRAMBAST	Botanique
M.	A. BONNET	Botanique
M.	G. LAMATY	Chimie
M.	R. MARTY	Psychophysiologie
Mme	S. ROBIN.....	Physique
M.	R. CORRIU (I.U.T.).....	Chimie
Mme	N. PARIS	Physiologie végétale
M.	J. ZARZYCKI	Sciences des matériaux (Physique du Solide)
M.	S. GROMB.....	Chimie Physique
M.	F. SCHUE	Chimie Organique
M.	M. MAURIN	Chimie Minérale
M.	P. SABATIER	Mathématiques
M.	L. THALER	Paleontologie

Professeurs sans chaire :

M.	G. TOURNE	Chimie
M.	J. REMY	Géologie
M.	P. DEMANGEON	Géologie
M.	E. GROUBERT	Physique
Mme	H. GUASTALLA	Biologie physico-chimique
M.	R. LENEL	Biologie Animale
M.	F. PROUST	Géologie
M.	A. BASSOMPIERRE	Physique
M.	N. ROBY	Mathématiques
M.	R. GAUFRES	Chimie
M.	J. PARIS	Zoologie
M.	G. BOUGNOT	Physique
M.	M. ROUZEYRE	Physique
M.	P. MOLINO	Mathématiques
M.	J. LEGRAND	Physiologie Animale
M.	R. JONARD	Botanique
M.	R. CANO (I.U.T.)	Mesures Physiques
M.	J.P. FILLARD (I.U.T.- NIMES)	Génie Electrique
M.	J.M. MORETTI	Biochimie
M.	J.L. IMBACH	Chimie
M.	C. GOUT	Physique
M.	H. MATHIEU	E.E.A. Electronique
M.	C. DURANTE	Automatique

Professeurs Associés :

M.	E. AKUTOWICZ	Mathématiques
M.	A. MICALI	Mathématiques
M.	C. VAGO	Biologie Animale
M.	L. DAUZIER	Physiologie Animale
M.	Y. CORMARY	Sciences et Techniques de l'eau (Hydrologie)

Maîtres de Conférences :

M.	G. LOUPIAS	Mathématiques
M.	Ch. CASTAING	Mathématiques

M.	J.D. BAYLE	Physiologie Animale
M.	R. HAKIM	Mathématiques
Mme	M. HAKIM	Mathématiques
M.	F. HALLE	Biologie Végétale
M.	G. MASCHERPA	Chimie
M.	F. LAPSCHER	Mathématiques
M.	J. GARCIA (I.U.T.)	Génie Mécanique
M.	M. DENIZOT	Biologie Végétale
M.	B. BRUN	Chimie Physique
M.	L. GIRAL	Chimie Organique
M.	L. LASSABATERE (I.U.T.)	Mesures Physiques
M.	J.P. TRILLES (I.U.T.)	Biologie Appliquée
M.	G. LECOY (I.U.T.)	Génie Electrique
M.	G. BORDURE (I.U.T.)	Génie Electrique
M.	Y. PIETRASANTA (E.N.S.I.)	Chimie Appliquée
M.	M. AMANIEU (Sc. & Tech.)	Hydrologie et mariculture
M.	J. CROUZET (Sc. & Tech.)	Biochimie Appliquée
M.	A. COMMEYRAS	Chimie Organique
M.	J.L. ROBERT (I.U.T. - NIMES)	Génie Electrique
M.	P. LOUIS	Géophysique Appliquée
Mlle	M. LEVY (I.U.T.)	Chimie
M.	J. LAGARRIGUE (I.U.T.)	Biologie Appliquée
M.	Cl. DROGUE (Sc. & Tech.)	Hydrogéologie
M.	P. GENESTE (E.N.S.I.)	Chimie Physique Appliquée
M.	J. CHEFTEL (Sc. & Tech.)	Biochimie Appliquée à l'Alimentation
M.	M. AVEROUS (I.U.T. - NIMES)	Génie Electrique
M.	B. LEMAIRE (Sc. & Tech.)	Mathématiques appliquées Informatique
M.	M. VALADIER	Mathématiques
M.	O. MAISONNEUVE (I.U.T.)	Informatique
M.	P. DELORD	Physique
M.	M. GODRON	Ecologie Végétale

Maîtres de Conférences Associés :

M.	C. MAURIN	Biologie Animale
M.	P. JOUANNA (I.U.T.)	Génie Civil

Chargés d'Enseignement :

M.	M. LEFRANC	Mathématiques
M.	Y. ESCOUFFIER	Informatique
M.	B. FILLIATRE	Informatique
M.	Y. CESARI (I.U.T.)	Informatique
M.	P. BESANCON	Physiologie de la nutri- tion appliquée à l'alimen- tion
M.	R. BEN AIM	Génie Chimique et traite- ment des eaux

Chargé des fonctions de Maître de Conférences :

M. G. SAUMADE (I.U.T.)

Chargés de cours :

M. J. GUIN (I.P.A.)
M. Cl. PEROCHON (I.U.T.)
M. M. MOUTON (I.U.T.)

SOMMAIRE

	Pages
<u>INTRODUCTION</u> :	1
<u>MATERIEL ET METHODES</u> :	7
I - <u>Souris non irradiées</u> :	7
A - Les souris :	7
B - Les cellules :	7
C - Incubation des cellules :	8
D - Extraction de l'hémoglobine :	8
E - Traitement des hémoglobines :	9
II - <u>Souris irradiées</u> :	12
A - Radiochimères :	12
B - Cellules souche :	12
C - Injection de cellules souche dans les souris irradiées :	12
D - Synthèse protéique dans les colonies :	13
E - Mesure de la radioactivité :	13
<u>RESULTATS</u> :	14
I - <u>Etude des hémoglobines de souris en fonction de l'âge, souche C3H</u> :	14
A - Atlas des chaînes de globines présentes chez la souris C3H :	14
a - Les hémoglobines :	14
b - Les chaînes de globines :	16
c - Cartes peptidiques :	18
d - Résumé :	18
B - Hétérogénéité de la chaîne α :	19
a - Souris C3H adultes :	19
b - Souris C3H au cours de son développement de l'état foetal à l'état adulte :	22
c - Résumé :	22
II - <u>Influence du milieu sur la nature des chaînes synthétisées étudiées à l'aide des radiochimères</u> :	23
a - Mode opératoire :	24
b - Résultats :	25
c - Résumé :	27
<u>DISCUSSION</u> :	29
<u>RÉSUMÉ ET CONCLUSION</u> :	39
<u>REFERENCES</u>	

INTRODUCTION

La majorité des auteurs admettent que la différenciation cellulaire résulte de la différenciation génique. Récemment WASSERMAN (1972) a élaboré une théorie qui rend compte de la différenciation cellulaire ainsi que de la morphogénèse, uniquement par des mécanismes mettant en jeu la différenciation génique.

L'étude de la différenciation génique, c'est-à-dire l'étude au niveau moléculaire des mécanismes responsables de l'activation ou de l'inactivation d'un gène, de plusieurs gènes ou encore d'un groupe de gènes structuraux ou non, est donc indispensable si l'on veut étudier la différenciation cellulaire.

Lorsque l'on travaille sur l'activation des gènes dans les cellules eucaryotes, le plus souvent c'est l'expression génique que l'on observe, c'est-à-dire la synthèse protéique. Pour cela il faut disposer de marqueurs génétiques : des chaînes polypeptidiques synthétisées à partir de gènes spécifiques.

L'hémoglobine est un marqueur génétique de choix. En effet par l'étude des Hb anormales, des maladies moléculaires (thalassémie, sicklémie,.....) on a pu montrer que chaque chaîne polypeptidique était sous le contrôle d'un gène spécifique.

L'hémoglobine est chez les vertébrés supérieurs une protéine d'un poids moléculaire de 64 000 environ, composée de quatre sous-unités de poids moléculaire de 16 000 chacune. Ces sous-unités que l'on appelle des chaînes d'hémoglobine contiennent un atome de fer lié à un groupe tétrapyrrolique. Elles peuvent être semblables deux à deux comme dans le cas des hémoglobines A et F humaines qui ont les structures $\alpha_2\beta_2$ et $\alpha_2\gamma_2$, ou bien être identiques comme c'est le cas dans l'hémoglobine humaine "Bart's" qui a la structure γ_4 . α , β et γ désignent respectivement dans ces formules des chaînes d'hémoglobine différant les unes des autres par la séquence de leurs acides aminés.

On a constaté chez l'homme qu'au cours de son développement ontogénique, plusieurs types de chaînes non α étaient successivement synthétisées : la chaî-

ne ϵ est observable dans le foetus âgé de 9 à 10 semaines (HUEHNS 1964) puis disparaît, remplacé par les chaînes δ et β qui sont présentes jusqu'à la naissance. On a constaté dans le cas des chaînes β et γ que ces dernières étaient synthétisées simultanément dans la même cellule (DAN, 1967) ; le taux de synthèse de la chaîne β croissant au détriment de l'autre jusqu'à devenir la seule synthétisée activement chez l'adulte. Les Anglo-Saxons appellent ce phénomène le "Foetal-Adult Switch".

Chacune de ces différentes chaînes polypeptidiques étant sous le contrôle d'un gène spécifique, l'érythropoïèse se présente comme un excellent modèle pour l'étude de la différenciation génique. De plus, l'hémoglobine constitue la quasi-totalité des protéines présentes dans l'érythrocyte, ce qui facilite son identification.

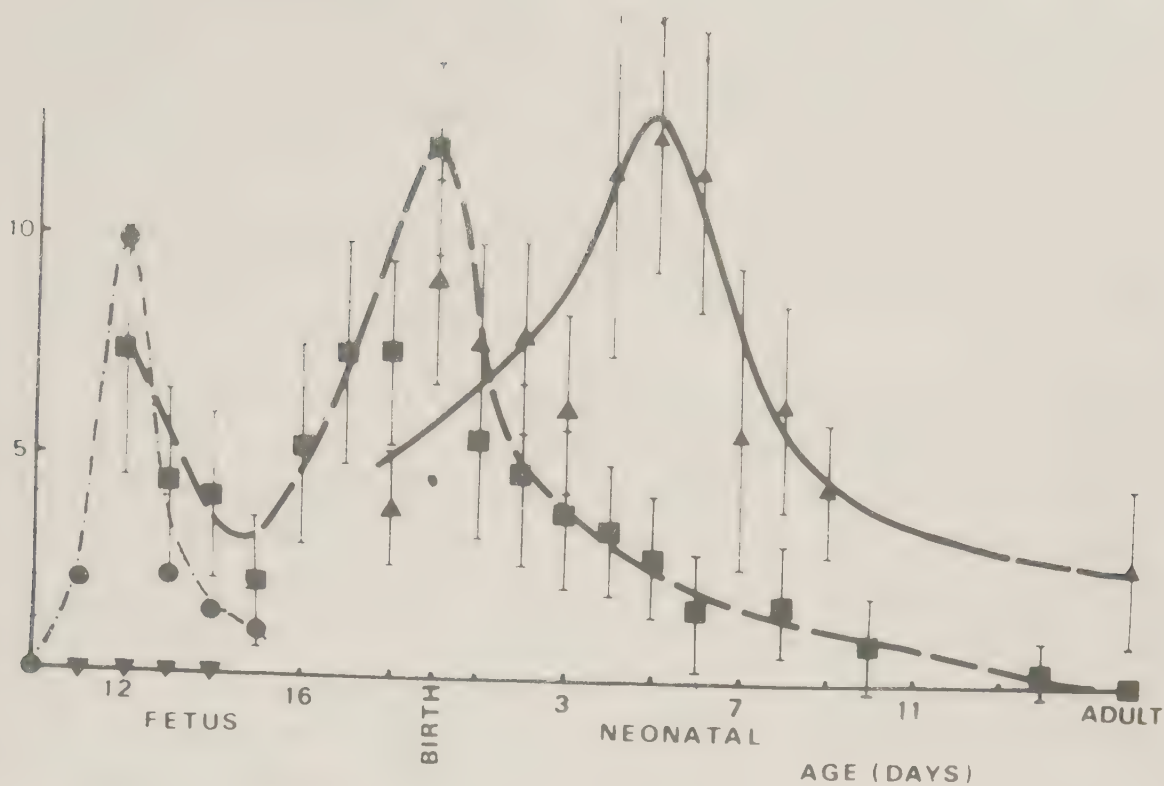
L'érythropoïèse est bien connue chez l'homme (KNOLL, 1949), et chez la souris (BORGHESE, 1959). Chez l'homme, elle a lieu successivement dans plusieurs organes. Elle apparaît d'abord dans les flots sanguins le 15ème jour après la conception, y passe par un maximum au bout de 6 semaines et cesse après 12 semaines. Six semaines après la conception, l'érythropoïèse apparaît dans le foie, y passe par un maximum 12 semaines après la conception puis diminue jusqu'à la naissance.

Dans la rate elle apparaît 3 mois après la conception, passe par un maximum le 5ème mois et disparaît le 7ème mois après la conception. Enfin, l'érythropoïèse apparaît dans la moelle osseuse le 5ème mois après la conception et y reste active pendant l'âge adulte. Malheureusement certaines études expérimentales sont difficilement réalisables dans le cas de l'homme. Aussi avons-nous choisi d'utiliser comme matériel la souris (souche C3H).

En tant que mammifère, la souris est une parente relativement proche de l'homme, et qualitativement l'érythropoïèse ne diffère pas beaucoup chez l'homme et chez la souris.

Chez la souris la gestation dure entre 19 et 20 jours. L'érythropoïèse commence dans les flots sanguins du sac vitellin à partir du 8ème jour de gestation. Les érythrocytes du sac vitellin sont remplacés à partir du 14ème jour par les érythrocytes synthétisés par le foie. Le foie est actif jusqu'à la naissance. Le 15ème jour de gestation la rate devient active en même temps que la moelle osseuse qui restera après la naissance le site principal de l'érythropoïèse.

FIGURE I



Nombre relatif de colonies apparaissant sur la rate d'une souris irradiée, en fonction de l'âge de la souris donneuse et de la nature de son organe érythropoïétique. (Injection de 10^5 cellules nucléées).

▼ Sac vitellin

● Sang périphérique (colonies obtenues par injection de 10^6 cellules)

■ Foie

▲ Rate

(d'après NIEWISCH et al., 1970).

(Sang périphérique : sang présent dans le fœtus à l'exclusion du sang maternel).

Tout au long de ce travail il sera question de la cellule-souche. Une cellule-souche est à l'origine d'une ou de plusieurs lignées cellulaires que l'on appelle des différons. Ainsi la cellule-souche responsable du différon érythroblastique est capable d'initier deux autres différons, myéloblastique et mégakariocytaire.

La production continue dans l'organisme d'une cellule différenciée telle que l'érythrocyte nécessite que la cellule-souche possède deux fonctions : différenciation et auto-conservation

La cellule-souche n'a pas encore été caractérisée ni isolée avec certitude. Cependant, on a pu la représenter par un modèle stochastique et les paramètres qui la caractérisent (probabilité d'auto-conservation et probabilité de différenciation) ont été déterminés (VOGEL et al. 1969), dans le cas de la souris C3H. Cette détermination a été rendue possible grâce à l'existence d'une méthode de transplantation des cellules-souche d'une souris à une autre (TILL et McCULLOCH, 1961), dans des conditions où le nombre de cellules-souche présentes à un moment donné dans un organe érythropoïétique de la souris réceptrice peut être déterminé (NIEWISCH et al., 1970).

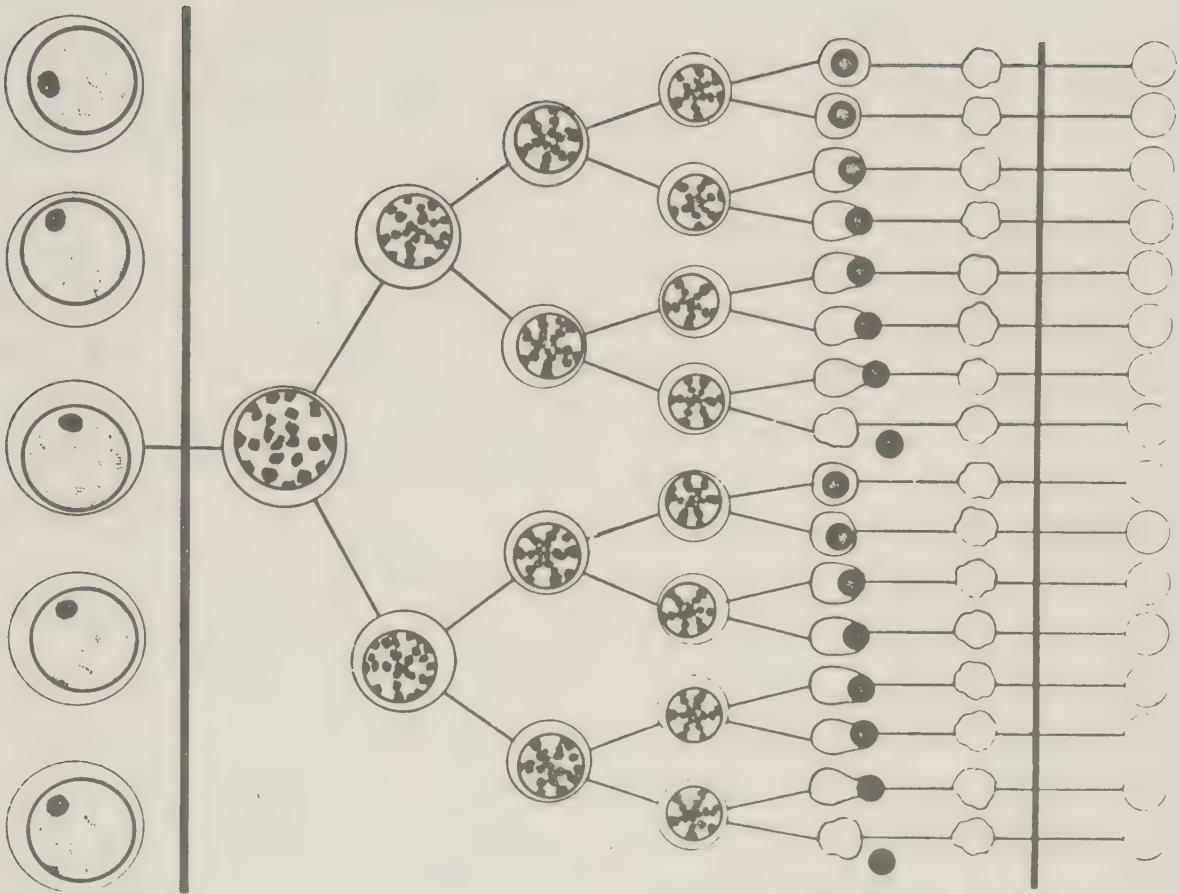
Dans la figure 1, le nombre relatif de cellules-souche présentes dans chaque site hématopoïétique est déterminé en fonction de l'âge du fœtus depuis le 12^{ème} jour de gestation jusqu'à l'âge adulte (NIEWISCH et al. 1970).

On voit que les cellules-souche présentes dans le sac vitellin disparaissent dès le 11^{ème} jour, sont remplacées par une population de cellules-souche qui apparaît d'abord dans le foie le 13^{ème} jour de gestation, enfin deux autres populations de cellules-souche apparaissent dans la rate et la moelle osseuse vers le 15^{ème} jour de gestation.

Il ne faut pas perdre de vue que la cellule-souche n'a jusqu'à présent qu'une existence théorique puisqu'elle n'est définie que par des critères opérationnels, bien que son isolement, non encore confirmé d'une manière définitive, ait été annoncé (van BEKKUM et al. 1971, NIEWISCH et al. 1967).

Dans le cas de la souris, certains auteurs (FANTONI et al., 1969, STEINER 1972) ont reliés ces résultats à l'érythropoïèse telle qu'elle avait été observée.

FIGURE II



- MATURATION DE LA LIGNEE ERYTHROBLASTIQUE -

- A gauche : le compartiment des cellules-souche.
 Au centre : le compartiment dans lequel se produit la maturation.
 A droite : le compartiment du sang circulant.

(D'après M. BESSIS, Cellules du Sang, Masson ed., PARIS (1972))

Le différon érythroblastique :

La cellule-souche au cours de sa différenciation passe par plusieurs états successifs que l'on peut distinguer les uns des autres par des critères morphologiques. C'est ainsi que l'on a pu distinguer 7 étapes dans la maturation de la cellule-souche depuis l'état de cellule-souche jusqu'à l'état d'érythrocyte (Fig. 2).

Dans les cellules les moins différenciées, le volume du noyau est important devant celui du cytoplasme ; il y a synthèse d'ADN et d'ARN messenger tandis qu'il n'y a pas de synthèse d'hémoglobine. Au fur et à mesure que la cellule poursuit son développement, le rapport des volumes noyau-cytoplasme diminue, la capacité de synthétiser l'ARN messenger disparaît tandis que l'hémoglobine est synthétisée activement.

On constate cependant des différences entre les différons érythroblastiques qui se succèdent au cours de l'érythropoïèse. La différence la plus frappante existe entre le différon initié dans les îlots sanguins et les autres différons initiés dans le foie, la rate ou la moelle osseuse de la souris.

Ainsi, l'érythrocyte du sac vitellin conserve en général son noyau (plus de 50 % des érythrocytes du sac vitellin sont nucléés), pycnotique certes, mais qui n'est pas expulsé comme c'est le cas au stade acidophile dans les différons issus du foie, de la rate ou de la moelle osseuse de la souris C3H (STEINER 1972).

Dans la souris C3H, STEINER (1972) a montré que l'érythrocyte du sac vitellin contenait environ 6 fois plus d'hémoglobine que l'érythrocyte adulte (100 pg contre 16 pg pour l'érythrocyte adulte) et 3 fois plus d'hémoglobine que l'érythrocyte issu du foie du fœtus (100 pg contre 30 pg).

De plus selon MARKS et al. (1966), dans la souris C57BL, la synthèse d'ARN messenger s'arrêterait au stade polychromatophile dans les différons issus du foie, de la rate ou de la moelle osseuse, tandis qu'elle se poursuivrait jusqu'au stade orthochromatophile dans le différon issu des îlots sanguins. Il y a très peu de raisons de croire que ce n'est pas aussi le cas de la souris de type C3H.

Le temps séparant un stade du suivant diffère selon le site où a été initié le différon. Il est de 20 à 24 heures par génération cellulaire pour le

différon issu des flots sanguins, alors qu'il est de 11 à 12 heures pour les différons issus des autres organes érythropoïétiques (STEINER, 1972).

Enfin, le différon érythroblastique issu des flots sanguins diffère des autres comme nous l'avons montré dans ce travail, par le type d'hémoglobine synthétisé par les cellules qui le constituent. Nous avons en effet étudié les types de chaînes d'hémoglobine synthétisées par la souris C3H au cours de son développement du stade embryonnaire au stade adulte.

Ce travail préliminaire qui n'avait pas été réalisé pour la souris de souche C3H, était indispensable. Il est nécessaire en effet de connaître le type d'hémoglobine synthétisé par les différentes cellules érythroblastiques qui se succèdent au cours du développement de la souris C3H. C'est à cette condition que l'on peut envisager de faire varier le milieu extérieur de ces cellules, en vue d'entraîner des modifications dans les taux de synthèse des différentes hémoglobines.

On peut examiner la possibilité d'altérer expérimentalement la proportion de diverses composantes d'hémoglobine présentes dans une même cellule, en prenant pour cible soit des stades cellulaires relativement tardifs, soit des stades précoces.

En ce qui concerne les stades relativement tardifs, il semble qu'il soit possible, "*in vitro*", d'activer la synthèse de chaînes d'hémoglobine qui normalement ne sont pas synthétisées "*in vivo*" (synthèse d'hémoglobine foetale dans les érythroblastes adultes à un taux très supérieur à ceux normalement observés) (HALL et MOTULSKY, 1968, GABUZDA et al. (1971), SALLEI et al. (en préparation) ; cependant certains auteurs ont mis en doute la validité de ces résultats (LEBEAU et ROSA 1972 ; WOOD et al. 1972).

Dans le présent travail nous étudions l'influence de modification du milieu sur les types d'hémoglobine synthétisés, lorsque cette influence s'exerce non sur des stades cellulaires avancés seulement, mais sur une série de stades y compris les plus précoces.

Les milieux d'incubation artificiels ne permettent pas malheureusement la différenciation de la cellule érythropoïétique de l'état de cellule-souche jusqu'à l'état d'érythrocyte ; la seule façon de provoquer cette différenciation est actuellement la méthode "*in vivo*" de transplantation des cellules souche d'une souris à une autre. Nous utilisons ici des souris de souche C3H dont

Le compartiment endogène de cellules souche a été détruit par irradiation létale dans une bombe au cobalt, et se trouve remplacé par des cellules souche d'origine exogène.

Nous avons donc étudié grâce à la méthode de transplantation "*in vivo*" de cellule souche, l'effet de la modification de l'environnement ou peut-être du micro-environnement sur la cellule souche en examinant les types de chaînes d'hémoglobine synthétisées par les cellules érythropoïétiques issues de ces cellules souche placées dans un milieu où l'environnement avait été modifié.

Le travail présenté est donc le suivant : nous avons déterminé l'ordre dans lequel les chaînes d'hémoglobine sont activées puis inactivées au cours de l'ontogenèse chez la souris C3H ; nous avons ensuite tenté de relier les résultats observés aux différents sites où sont présentes les cellules souche responsables de l'érythropoïèse. Enfin, en modifiant artificiellement le milieu (irradiation par les rayons γ) nous avons spécifiquement inactivé puis réactivé la synthèse d'une chaîne α d'hémoglobine.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Nous allons exposer dans ce chapitre les méthodes utilisées dans ce travail, à l'exception de certaines techniques très particulières qui seront décrites par la suite.

I - SOURIS NON IRRADIÉES :

A - Les souris :

Les souris de souche C3H, gravides ou non gravides, proviennent du Centre de Sélection et d'Élevage des Animaux de Laboratoire (CNRS, Orléans-la-Source). Le jour de gestation des foetus présents dans la souris C3H est déterminé à $\pm$ 12 heures près par la méthode du bouchon vaginal (RUGH, 1968).

B - Les cellules :

Les érythrocytes présents dans la circulation sanguine du foetus de la souris C3H, le jour de gestation choisi, s'obtiennent ainsi. On sacrifie les souris gravides par dislocation cérébrale. Les foetus sont ensuite expulsés de l'utérus puis séparés du placenta, ce qui provoque une hémorragie chez le foetus. Cette hémorragie a lieu tandis que le foetus est immergé dans une solution saline contenant de l'héparine (NaCl 0,13M, KCl 0,005M, $MgCl_2$ 0,007M) tamponnée à pH 7,2 par NH_4HCO_3 . Les cellules sanguines sont ensuite séparées des débris par filtration sur une flanelle et lavées par sédimentation trois fois de suite à 1500 rpm dans la même solution saline que précédemment.

Pour obtenir les érythrocytes présents chez la souris C3H adulte, on anesthésie cette dernière par le chloroforme et le sang est prélevé par ponction cardiaque. Les cellules sanguines sont alors lavées par sédimentation comme précédemment.

C - Incubation de cellules :

Il est quelquefois nécessaire de mesurer le taux de synthèse des hémoglobines présentes dans les cellules érythropoïétiques. Ces cellules sont soit les érythroblastes présents dans la circulation sanguine du fœtus le 13^{ème} jour de gestation, soit les réticulocytes présents dans le sang de la souris C3H adulte. Dans ce dernier cas, le nombre de réticulocytes normalement présents dans le sang de la souris adulte étant trop faible, il convient de l'augmenter en traitant les souris avec de la phénylhydrazine tous les jours pendant 8 jours selon les conditions établies par EVANS et LINGREL (1969).

Les cellules sanguines sont traitées comme précédemment et mises en incubation dans un milieu de Krebs-Ringer légèrement modifié (MATIOLI et EYLAR, 1964). L'incubation a lieu à 37°.

Le milieu contient tous les acides aminés à l'exception de la valine, de l'isoleucine ou des deux, qui sont rajoutées après une préincubation de 30 minutes sous forme de valine tritiée et d'isoleucine marquée au ^{14}C (la préincubation a pour but de réduire la concentration en valine et en isoleucine non radioactives qui existent dans les cellules sanguines au moment où on les prélève). Les acides aminés marqués proviennent du service des Molécules marquées CEA, France. L'activité de la valine est de 25 mCi/mM et celle de l'isoleucine est de 90 mCi/mM. On dilue la valine tritiée avec de la valine non radioactive pour avoir des activités spécifiques semblables. L'incubation dure 1 heure 30 à 37° sous agitation dans un incubateur de type Gilson.

Après incubation, les cellules sont lavées par sédimentation selon les conditions exposées précédemment. On extrait ensuite l'hémoglobine de la façon suivante :

D - Extraction d'hémoglobine :

Pour éviter la désagrégation des polysomes, des ribosomes et du matériel nucléaire, on provoque la lyse avec une solution* contenant $\text{KCl } 1.10^{-3}\text{M}$, $\text{MgCl}_2 \ 1,5. 10^{-3}\text{M}$ et $\text{Tris } 1.10^{-3}\text{M}$; on dépose ensuite le lysat à la surface d'un tube à sédimentation contenant une solution de sucrose à 20 %. On centrifuge alors pendant 2 heures à 23 000 rpm sur un rotor à godets oscillants de type SW 25 B dans une centrifugeuse Spinco et on recueille le surnageant. Toutes ces opérations ont lieu à 4°.

* pH 7,2

C - Incubation de cellules :

Il est quelquefois nécessaire de mesurer le taux de synthèse des hémoglobines présentes dans les cellules érythropoïétiques. Ces cellules sont soit les érythroblastes présents dans la circulation sanguine du fœtus le 13^{ème} jour de gestation, soit les réticulocytes présents dans le sang de la souris C3H adulte. Dans ce dernier cas, le nombre de réticulocytes normalement présents dans le sang de la souris adulte étant trop faible, il convient de l'augmenter en traitant les souris avec de la phénylhydrazine tous les jours pendant 8 jours selon les conditions établies par EVANS et LINGREL (1969).

Les cellules sanguines sont traitées comme précédemment et mises en incubation dans un milieu de Krebs-Ringer légèrement modifié (MATIOLI et EYLAR, 1964). L'incubation a lieu à 37°.

Le milieu contient tous les acides aminés à l'exception de la valine, de l'isoleucine ou des deux, qui sont rajoutées après une préincubation de 30 minutes sous forme de valine tritiée et d'isoleucine marquée au ^{14}C (la préincubation a pour but de réduire la concentration en valine et en isoleucine non radioactives qui existent dans les cellules sanguines au moment où on les prélève). Les acides aminés marqués proviennent du service des Molécules marquées CEA, France. L'activité de la valine est de 25 mCi/mM et celle de l'isoleucine est de 90 mCi/mM. On dilue la valine tritiée avec de la valine non radioactive pour avoir des activités spécifiques semblables. L'incubation dure 1 heure 30 à 37° sous agitation dans un incubateur de type Gilson.

Après incubation, les cellules sont lavées par sédimentation selon les conditions exposées précédemment. On extrait ensuite l'hémoglobine de la façon suivante :

D - Extraction d'hémoglobine :

Pour éviter la désagrégation des polysomes, des ribosomes et du matériel nucléaire, on provoque la lyse avec une solution* contenant $\text{KCl } 1.10^{-3}\text{M}$, $\text{MgCl}_2 \ 1,5. 10^{-3}\text{M}$ et $\text{Tris } 1.10^{-3}\text{M}$; on dépose ensuite le lysat à la surface d'un tube à sédimentation contenant une solution de sucrose à 20 %. On centrifuge alors pendant 2 heures à 23 000 rpm sur un rotor à godets oscillants de type SW 25 B dans une centrifugeuse Spinco et on recueille le surnageant. Toutes ces opérations ont lieu à 4°.

* pH 7,2

E - Traitement des hémoglobines :

(1) - Réaction de l'hémoglobine avec l'iodoacétamide :

L'iodoacétamide provient de la Maison BDH Chemicals, Poole (Grande-Bretagne) ; la réaction avec l'hémoglobine se fait pendant 1 heure 30 selon la méthode de RIGGS (1966) à 20° dans un tampon phosphate de sodium. Le pH de ce tampon est 7,0, la concentration est 0,1 M en phosphate. La concentration de l'hémoglobine est de 10 mg/ml et l'iodoacétamide est en excès molaire par rapport à l'hémoglobine dans la proportion de 10 à 1.

(2) - Chromatographie des hémoglobines :

L'hémoglobine après dialyse à 4° contre le tampon initial de chromatographie est déposée au sommet d'une colonne de chromatographie. Les résines utilisées dans ce travail sont de deux types, DEAE cellulose (Whatman DE 52) et CM cellulose (Whatman CM 52). Les colonnes de chromatographie ont 35 cm de hauteur et un diamètre de 1 cm. On opère soit à 4° soit à température ambiante. Les hémoglobines sont éluées de la colonne en faisant varier le pH. Pour établir un gradient de pH, on utilise des chambres cylindriques de même diamètre et communiquant par la base (capacité de chaque chambre 500 ml).

Dans le cas de la DEAE cellulose, l'éluant est une solution Tris-HCl, 0,05M en Tris. Le pH initial est 9,0 mesuré à 20°. On le fait varier en utilisant 3 chambres contenant chacune 150 ml d'une solution Tris-HCl 0,05 M à des pH différents. La première chambre est à pH 9,0, la deuxième à pH 7,9 et la troisième à pH 6,8. Les débits sont de 40 à 60 ml/h.

Dans le cas de la CM cellulose, l'éluant est un tampon phosphate de sodium 0,01 M en $[PO_4^{=}]$: le pH varie de 6,7 à 8,0 grâce à deux chambres contenant chacune 150 ml de tampon, la première à pH 6,7 et la deuxième à pH 8,6. Le débit est de 25 à 30 ml/h.

(3) - Préparation de la globine :

Après séparation chromatographique, les hémoglobines sont lyophilisées puis l'hème est séparé de la globine en utilisant la méthode de précipitation à l'acétone acide de ANSON et MIRSKY (1930) Après séchage du précipité dans

un courant d'azote, la globine est redissoute soit dans l'urée 8M, soit dans la solution utilisée dans la chromatographie à contre-courant.

(4) - Chromatographie de la globine :

Nous avons utilisé deux méthodes pour séparer les chaînes polypeptidiques constitutives de la globine : la méthode de CLEGG et al. (1965) qui utilise la chromatographie sur CM cellulose en milieu urée 8M, et la méthode de KING et CRAIG (1955), c'est-à-dire la méthode par contre-courant.

Quand on chromatographie la globine sur une colonne de CM cellulose on utilise des colonnes de 15 cm de hauteur et de 1 cm de diamètre.

L'éluant de départ est un tampon NaH_2PO_4 , Na_2HPO_4 0,01 M en phosphate et urée 8M. Le pH reste constant à 6,7 et la force ionique varie de 0,01 M à 0,05M en phosphate ; le débit est de 30 ml/h et la température de 20°.

On a isolé ainsi les chaînes de globine que l'on soumet ensuite à une chromatographie sur Sephadex G 25 équilibré dans l'acide formique 2 % pour éliminer l'urée. Les chaînes de globine sont ensuite lyophilisées et soumises à d'autres analyses.

Dans la chromatographie par contre-courant, les deux phases sont obtenues à partir d'un mélange contenant : 2-butanol, acide formique, acide dichloroacétique, 2-mercaptoéthanol, eau, dans les proportions 449/10/5/1/535, vol/vol (HILL et CRAIG, 1959) (l'acide dichloroacétique et le mercaptoéthanol sont redistillés).

Ce mélange est agité 45 minutes et on laisse la décantation se faire pendant la nuit.

La séparation des chaînes de globine se fait en 30 transferts à la température de 20°.

Après isolement des chaînes de globine, on dialyse les chaînes contre de l'eau distillée pour éliminer l'acide dichloroacétique et on concentre.

(5) - Hydrolyse par le bromure de cyanogène et résolution du mélange résultant :

Les chaînes polypeptidiques sont hydrolysées par le bromure de cyanogène au niveau de la méthionine. La chaîne α d'hémoglobine est soumise à l'hy-

drolyse par le bromure de cyanogène ; les conditions de l'hydrolyse sont celles de SCHROEDER et al. (1969). L'hydrolyse dure de 36 à 48 heures.

Après hydrolyse le mélange résultant est lyophilisé pour éliminer l'excès de bromure de cyanogène. On dissout le résidu dans l'acide acétique 30 % et la solution est soumise à une séparation sur du Sephadex G 100 équilibré avec de l'acide acétique 30 %. La longueur de la colonne est de 100 cm, son diamètre de 2 cm. Le débit est de 15 ml/h.

Chaque pic est collecté séparément et lyophilisé de façon à éliminer l'acide acétique.

(6) - Digestion trypsique :

La trypsine provient de la maison Worthington et est traitée avec TPCK* pour supprimer l'activité chymotrypsique présente dans la trypsine, selon la méthode de CARPENTER (1967).

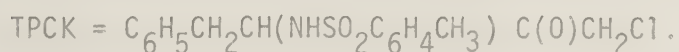
La digestion se réalise en milieu salin volatil (NH_4HCO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$) à pH 8,4 selon la méthode de SICK et al. (1967). L'hydrolyse se poursuit 2 heures à 37°. Les peptides insolubles sont alors précipités à pH 6,5 et chauffage 5 minutes à 90° puis éliminés par centrifugation. On lyophilise ensuite le surnageant pour éliminer les sels et on soumet les peptides à une chromatographie sur échangeur d'ions.

(7) - Cartes peptidiques :

Les cartes peptidiques des différentes chaînes de globine s'effectuent sur un analyseur de peptides de type Technicon. On applique la méthode de JONES (1964) qui utilise des tampons volatils pyridine-acide acétique, le pH variant de 3,1 à 5,0 de façon linéaire ; la hauteur des colonnes de chromatographie atteint 110 cm ; le diamètre intérieur est de 0,6 cm.

Les résines sont de type Dowex X 4 (Chromobeads Technicon type P) : le débit est de 30 ml/h et l'analyse dure 22 heures.

*



II - SOURIS IRRADIEES :

A - Radiochimères :

Une chimère est un organisme dont les cellules descendent de deux lignées zygotiques distinctes au moins (ANDERSON et al., 1951).

Une radiochimère est donc un organisme qui a pu s'intégrer, par suite d'irradiation totale, des tissus ou des cellules provenant d'un autre organisme. Dans le cas de cette étude les souris C3H sont irradiées dans un irradiateur de type US-Nuclear, International Chemical & Nuclear Corporation, Irvine, Calif, USA. Elles reçoivent un rayonnement de 1100 R. Le compartiment des cellules souche endogènes est détruit. On injecte alors par piqûre intraveineuse des cellules nucléées provenant d'un organe hématopoïétique d'une autre souris de même souche. Les cellules souches présentes dans les cellules nucléées d'origine exogène donnent naissance à des colonies sur la rate de la souris irradiée. Ces colonies sont clonales (WU et al., 1967), c'est-à-dire que chaque colonie est initiée par une seule cellule souche. La souris irradiée est devenue une radiochimère.

B - Cellules souche :

Les cellules souche du foie de fœtus s'obtiennent comme suit ; les souris pleines sont sacrifiées le 13^{ème} jour de gestation. Le foie est prélevé sur les fœtus, les cellules sont dispersées et mises en suspension dans la solution saline par aspiration douce à travers une seringue. Les cellules sont ensuite lavées par sédimentation selon la méthode habituelle, puis elles sont comptées dans un hémocytomètre.

Les cellules souche présentes dans la rate des souris C3H adultes s'obtiennent en sacrifiant ces dernières. La rate est prélevée sur les souris, les cellules sont dispersées et mises en suspension dans la solution saline par aspiration douce à travers une seringue. Elles sont ensuite traitées comme précédemment.

C - Injection de cellules-souche dans les souris irradiées :

On injecte par piqûre intraveineuse 0,2 ml d'une solution contenant 10^7 environ de cellules nucléées à chacune des souris irradiées utilisées pour chaque expérience.

Si l'on considère que 10^5 cellules nucléées donnent naissance à une colonie à peu près (NIEWISCH et al., 1970), théoriquement la rate devrait être le siège d'une centaine de colonies individualisées. En réalité ces colonies se chevauchent, occupant toute la surface de la rate et ne sont pas distinctes les unes des autres. Si l'on injecte un nombre aussi grand de cellules, c'est pour obtenir le nombre de colonies le plus grand possible, et par là même le maximum de radioactivité incorporée par les cellules synthétisant de l'hémoglobine.

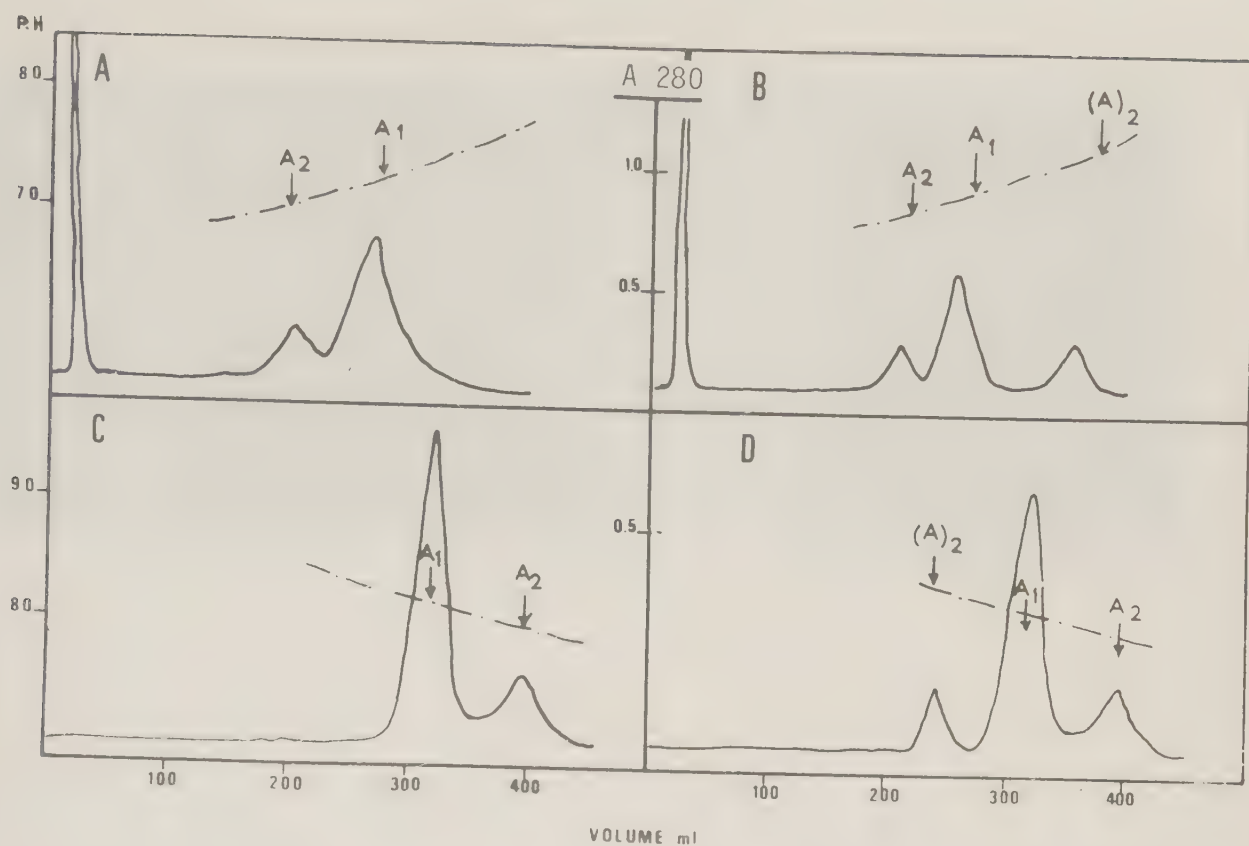
D - Synthèse protéique dans les colonies :

Le 8^{ème} jour après l'injection on sacrifie les radiochimères, on prélève les rates qui sont d'abord découpées en petits fragments, puis les cellules constitutives de chaque fragment sont dispersées et mises en suspension dans la solution saline par aspiration douce à travers une seringue. Les cellules sont ensuite lavées par sédimentation dans la solution saline puis mises dans un milieu d'incubation à 37° contenant de la valine tritiée et de l'isoleucine ^{14}C pendant 2 heures. Les conditions d'expérience concernant l'incubation, la lyse des cellules, les chromatographies successives de l'hémoglobine et de la globine, ainsi que le comptage des échantillons, sont les mêmes que celles exposées précédemment.

E - Mesure de la radioactivité :

Les échantillons dont on mesure la radioactivité sont lyophilisés (composants d'hémoglobine, chaînes α et non- α d'hémoglobine, peptides résultant de l'hydrolyse au bromure de cyanogène). On les redissout ensuite dans un minimum de tampon (tampon Tris HCl, pH 9,0 pour l'hémoglobine, acide acétique 30 % pour les chaînes α et non- α de l'hémoglobine ainsi que pour les peptides résultant de l'hydrolyse au bromure de cyanogène). Une partie aliquote de ces échantillons (0,10 ml environ) est mélangée avec 10 ml de mélange scintillant (Instagel-Packard) et comptée au moyen d'un compteur à scintillation liquide Packard 3375.

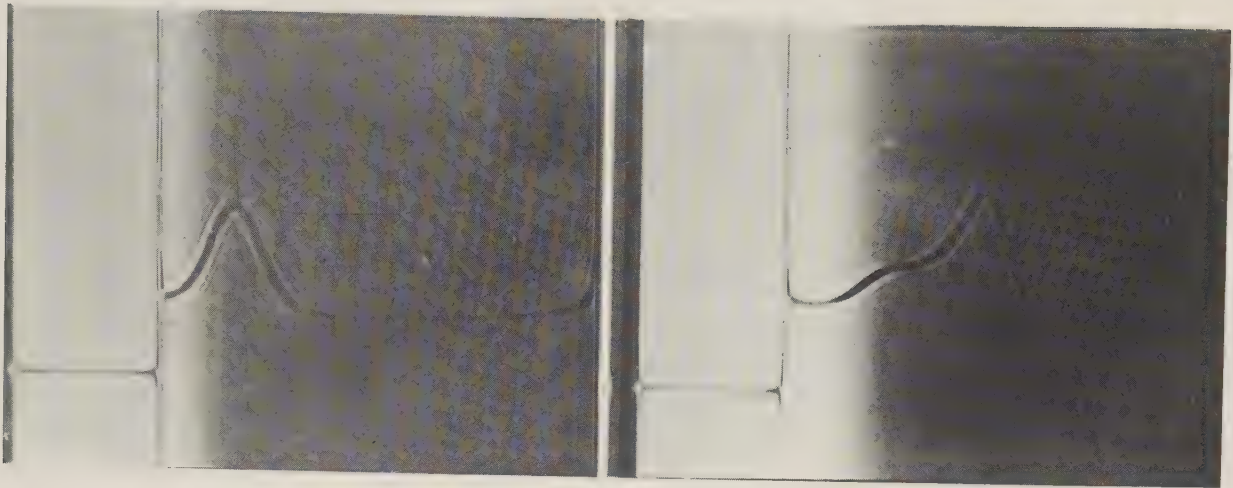
FIGURE III



Chromatographie sur échangeur d'ions des hémoglobines présentes chez la
souris C3H adulte

- A : Chromatographie sur CM-cellulose des hémoglobines après réaction de celles-ci avec l'iodoacétamide.
- B : Chromatographie sur CM-cellulose des hémoglobines non traitées avec l'iodoacétamide.
- C : Chromatographie sur DEAE-cellulose des hémoglobines après réaction avec l'iodoacétamide.
- D : Chromatographie sur DEAE-cellulose des hémoglobines non traitées avec l'iodoacétamide.

FIGURE IV



A

B

PROFIL DE SEDIMENTATION DES HEMOGLOBINES.

- A : Hémoglobine traitée à l'iodoacétamide, 45 minutes après avoir atteint la vitesse 50 000 rpm.
- B : Hémoglobine non traitée à l'iodoacétamide, 60 minutes après avoir atteint la vitesse de 50 000 rpm.

Les centrifugations ont été faites sur ultracentrifugeuse analytiques MSE (Measuring Scientific Equipment), Buckingham Gate, London SW1.

RESULTATS

I - ETUDE DES HEMOGLOBINES DE SOURIS EN FONCTION DE L'AGE - (SOUCHE C3H) :

A) - Atlas des chaînes de globine présentes chez la souris C3H :

a - Les Hémoglobines .

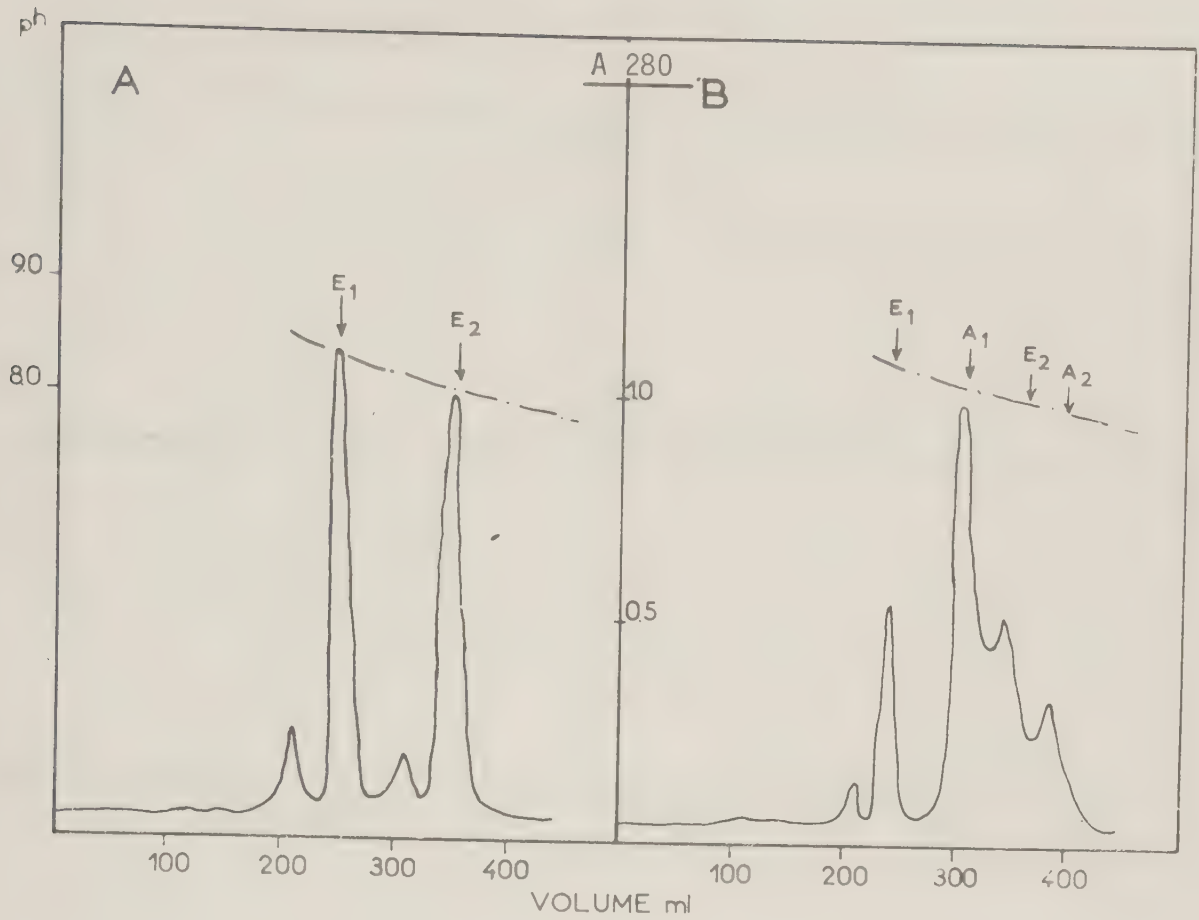
Les figures 3A et 3C montrent les profils chromatographiques obtenus respectivement sur CM cellulose et DEAE cellulose de l'hémoglobine de souris C3H adulte, traitée par l'iodoacétamide.

Si l'hémoglobine n'est pas traitée avec l'iodoacétamide, on voit, avec le vieillissement de l'échantillon, apparaître un troisième pic comme le montrent les figures 3B et 3D. C'est ce qui explique pourquoi RHINESMITH et al. (1964) et BARKER et al. (1968) ont constaté la présence de trois composantes dans l'hémoglobine de la souris C3H adulte.

Ce pic supplémentaire correspond à un produit de polymérisation d'une des composantes d'hémoglobine comme le montre la figure 4, qui représente un profil de sédimentation de l'hémoglobine de souris C3H adulte après une heure de sédimentation à 50 000 rpm. Les coefficients de sédimentation de chacun des pics sont respectivement de 4S et 7S. On peut donc dire que l'hémoglobine adulte de souris C3H contient deux composantes A1 et A2 nommées d'après leur ordre d'élution d'une colonne de DEAE cellulose, et que l'hémoglobine A2 est en quantité moindre que A1, puisqu'elle représente 15 % du total.

Dans la figure 5A, on observe le profil chromatographique sur DEAE cellulose de l'hémoglobine du sac vitellin le 13^{ème} jour de gestation. On voit que l'hémoglobine du sac vitellin est en réalité un mélange de deux hémoglobines que nous avons nommées E1 et E2 d'après leur ordre de passage sur DEAE cellulose. Ces hémoglobines ont des coefficients de sédimentation de 4,1 et

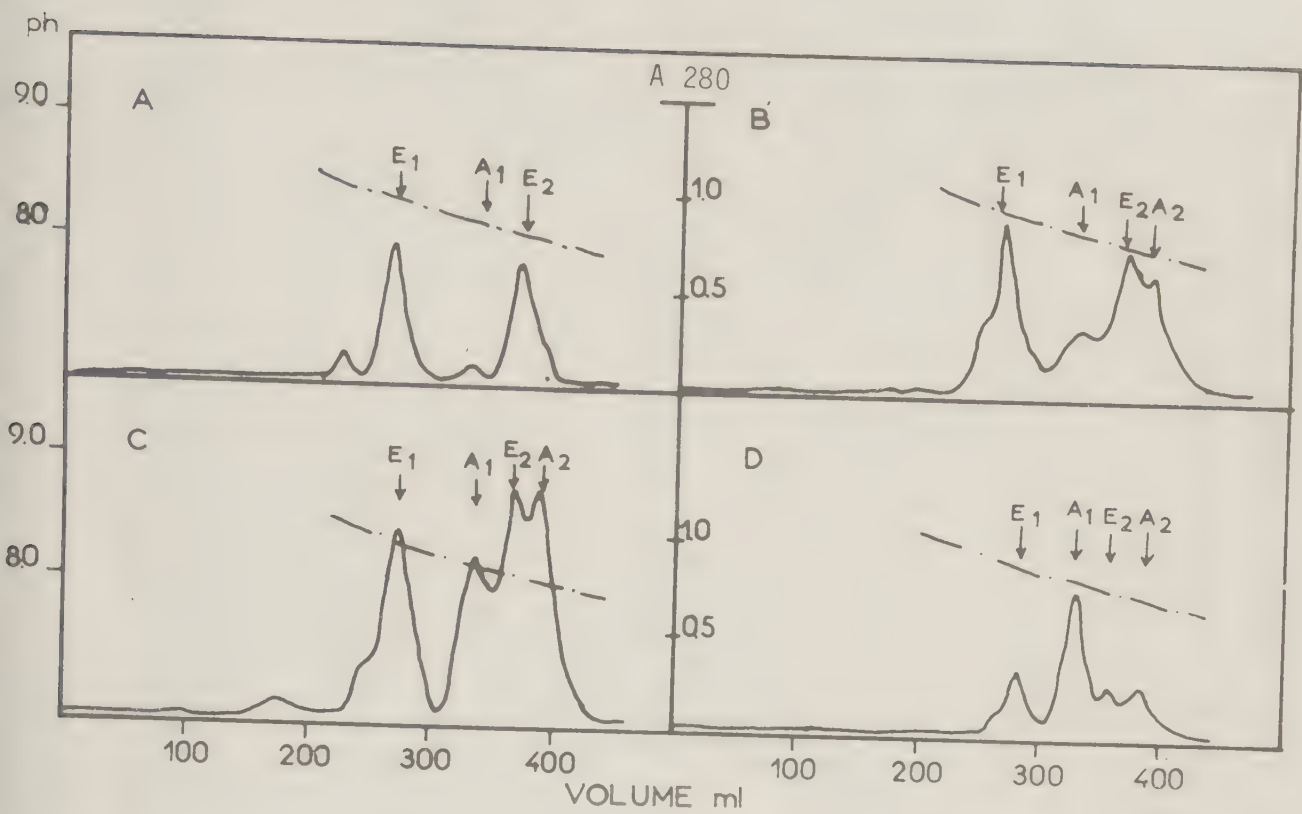
FIGURE V



Chromatographie des hémoglobines embryonnaires de la souris C3H le
13 ème jour de gestation

- A : Chromatographie sur DEAE-cellulose des hémoglobines présentes dans les érythroblastes du sac vitellin.
- B : Chromatographie sur DEAE-cellulose d'un mélange d'hémoglobine adulte et d'hémoglobine embryonnaire présente dans le sac vitellin.

FIGURE VI



Chromatographie sur DEAE-cellulose des hémoglobines présentes dans le
foetus de souris C3H

- A : le 13^{ème} jour de gestation
- B : le 14^{ème} jour de gestation
- C : le 15^{ème} jour de gestation
- D : le 16^{ème} jour de gestation.

TABLEAU I

Pourcentage des érythrocytes en provenance du sac vitellin, du foie foetal et de la mère, présents dans la circulation sanguine, et teneur en hémoglobine de chacun de ces érythrocytes,

	Sac vitellin		Foie foetal		Mère du foetus	
	-----		-----		-----	
	%	Teneur en Hb (g)	%	Teneur en Hb (g)	%	Teneur en Hb (g)
	(1)	(2)	(1)	(2)	(1)	(2)
13 ème jour de gestation	80 ± 10	70 ± 15 X 10 ⁻¹²	10 ± 10	24 + 7 7 x 10 ⁻¹²	10	12 ± 3 x 10 ⁻¹²
14 ème jour de gestation	30 ± 10	100 ± 20 x 10 ⁻¹²	70 ± 10	30 ± 8 x 10 ⁻¹²	2	12 ± 3 x 10 ⁻¹²
15 ème jour de gestation	15 ± 5	100 ± 20 x 10 ⁻¹²	85 ± 5	27 ± 8 x 10 ⁻¹²	0	
16 ème jour de gestation	5 ± 5	100 ± 20 x 10 ⁻¹²	95 ± 5	27 ± 8 x 10 ⁻¹²	0	

(1) D'après STEINER (1973), communication personnelle.

(2) D'après STEINER (1972) : Thèse, Technische Universität, Munich.

3,8 respectivement. Le petit pic présent avant E1 varie en quantité selon le temps de stockage de l'échantillon non traité avec l'iodoacétamide. On peut donc penser qu'il est lui aussi un produit de polymérisation d'une des hémoglobines E1 ou E2. Il y a aussi un petit pic présent avant E2 ; il correspond sans doute à l'hémoglobine présente dans les érythrocytes en provenance soit du foie foetal, soit du sang maternel (Tableau I). En effet la figure 5B montre qu'il s'agit probablement de la composante A1 de l'hémoglobine adulte.

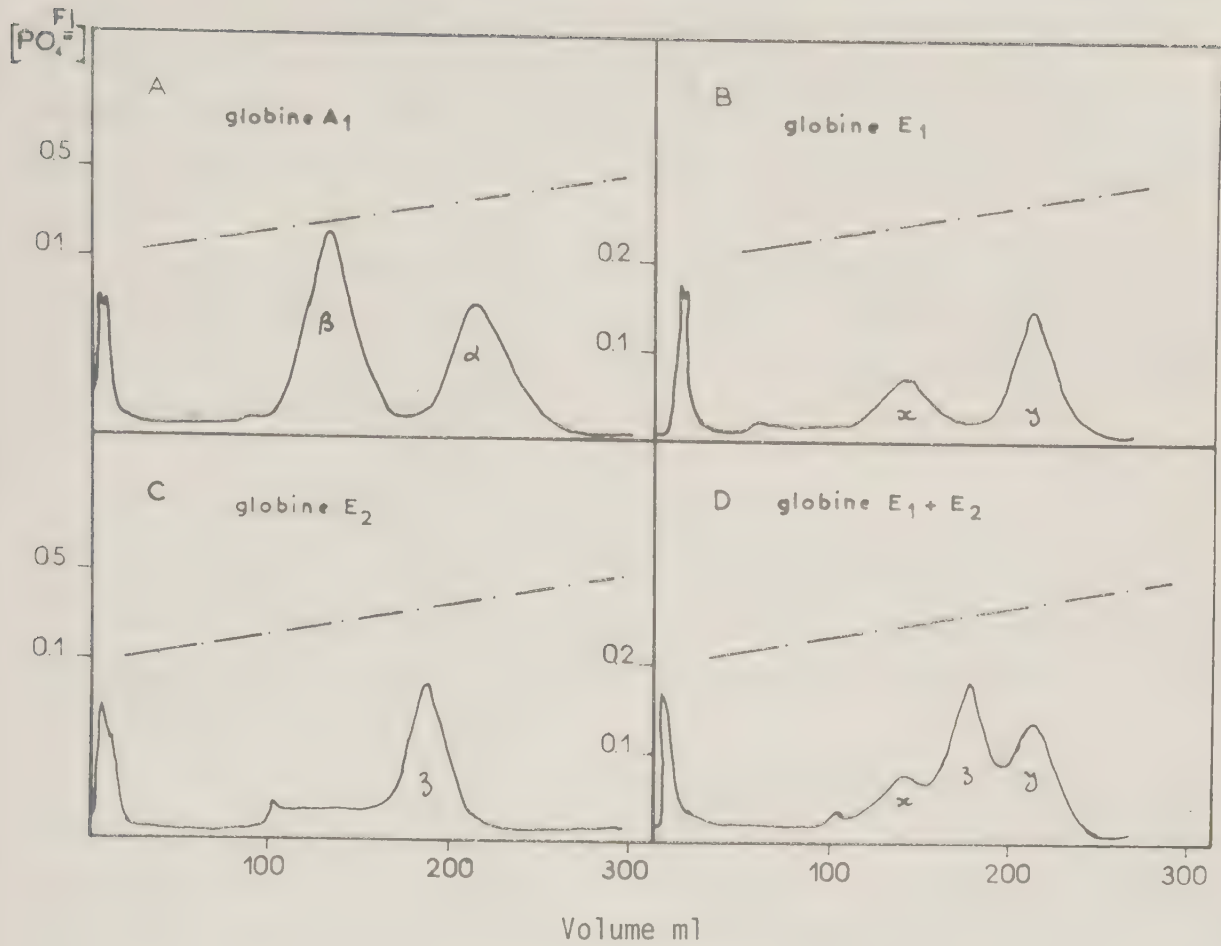
Dans la figure 5B nous avons représenté le profil chromatographique d'un mélange d'hémoglobines adulte et embryonnaire. On voit que l'hémoglobine A1 est éluée entre E1 et E2 et que A2 sort après E2. On constate donc que chromatographiquement tout au moins, les hémoglobines adulte et embryonnaire sont différentes.

Pour voir si les érythrocytes formés dans le foie foetal synthétisent une ou des composantes d'hémoglobine différentes, à la fois des hémoglobines embryonnaires et des hémoglobines adultes, nous avons fait la chromatographie des hémoglobines présentes dans les érythrocytes du fœtus, les 13^{ème}, 14^{ème}, 15^{ème} et 16^{ème} jours de gestation. STEINER (1972) a montré qu'apparaissaient dans la circulation sanguine, à partir du 13^{ème} jour, des érythrocytes formés dans le foie. Pour le 13^{ème} jusqu'au 16^{ème} des gestation, le Tableau I nous montre selon STEINER (1972) le nombre d'érythrocytes en provenance du foie et du sac vitellin, et le contenu d'hémoglobine par érythrocyte.

On voit que le nombre d'érythrocytes en provenance du sac vitellin, prédominant le 13^{ème} jour, a fortement décliné dès le 14^{ème} jour et devient presque négligeable le 16^{ème} jour. Le résultat des chromatographies des hémoglobines présentes dans le fœtus les 13^{ème}, 14^{ème} et 16^{ème} jours sont exposés dans la figure 6.

Il apparaît qu'il n'y a probablement pas de type nouveau d'hémoglobine synthétisé par les érythrocytes en provenance du foie foetal. Le 14^{ème} jour, l'HbA1 apparaît ainsi que l'HbA2 mais en proportion inverse, l'une par rapport à l'autre, de celle trouvée chez l'adulte ; le 15^{ème} jour la quantité de la composante A1 augmente par rapport à A2 et le 16^{ème} jour les rapports existants entre ces deux composantes sont presque identiques à ceux trouvés chez l'adulte.

FIGURE VII



Chromatographie sur CM cellulose de globines : les globines embryonnaires proviennent de foetus de souris le 13^e jour de gestation

- A : globine A₁
- B : globine E₁
- C : globine E₂
- D : mélange de globines E₁ et E₂.

(Toutes les chromatographies sont faites en milieu urée 8M selon la méthode de CLEGG et al., (1969).

On peut conclure de ces résultats qu'il existe probablement chez la souris C3H au cours de l'ontogénèse deux types seulement d'hémoglobine, les hémoglobines de type embryonnaire et les hémoglobines de type adulte. Il ne semble pas exister comme chez l'homme d'hémoglobine de type foetal, du moins pas en quantité décelable par les méthodes chromatographiques que nous employons.

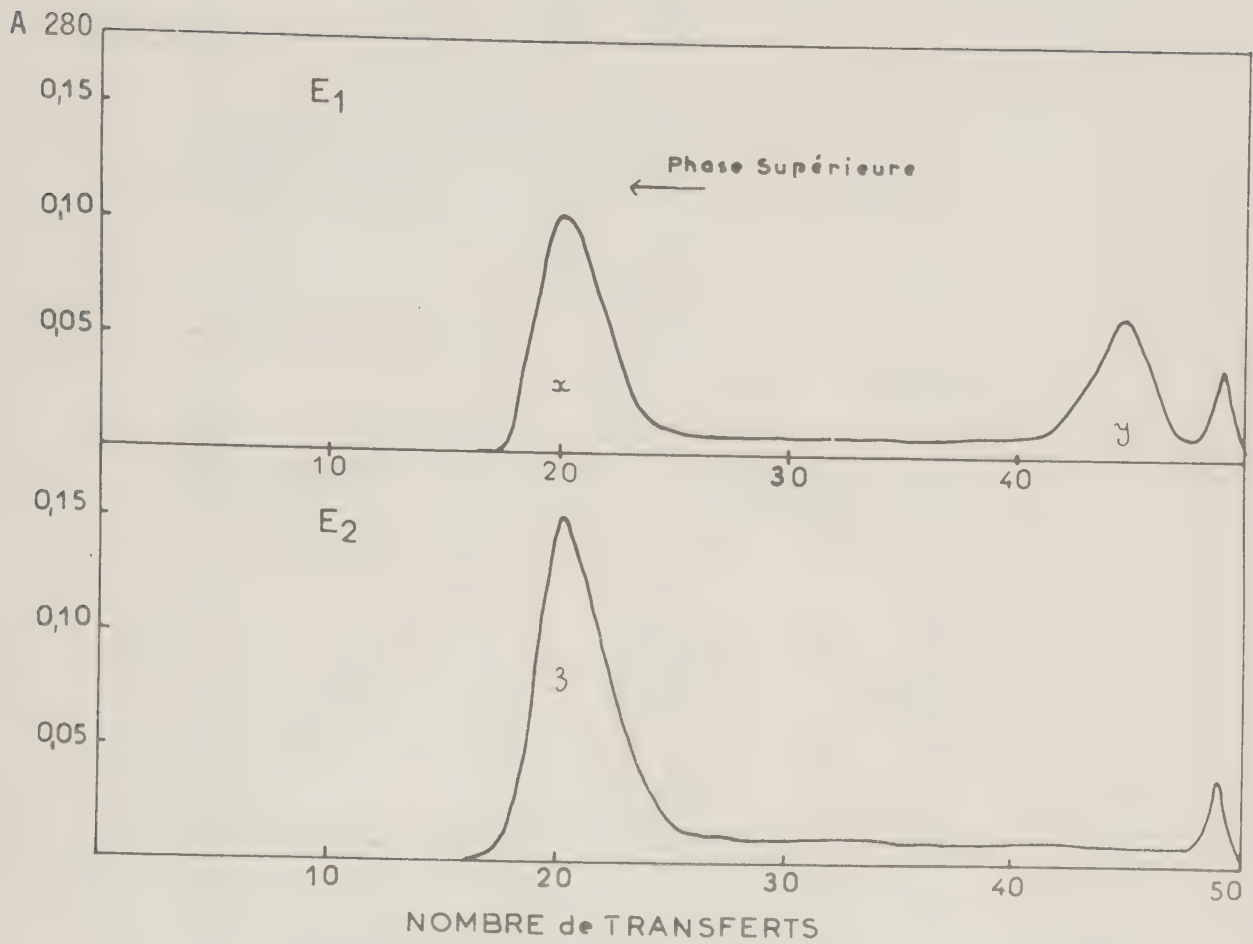
Cependant avec ces seuls résultats on peut certes affirmer que les érythrocytes issus du foie foetal fabriquent de l'hémoglobine du type adulte mais on ne peut pas affirmer aussi qu'ils ne synthétisent pas en même temps de l'hémoglobine embryonnaire.

b - Etude des chaînes de globine :

La figure 7 représente les profils chromatographiques des globines A1, E1 et E2 sur CM cellulose. Les conditions sont celles exposées au paragraphe "méthodes". Nous n'avons pas analysé la globine A2, en raison de son faible taux de synthèse chez l'adulte.

Le profil que l'on voit sur la figure 7A montre la séparation des chaînes α et non- α de la globine A1, identifiées par leur ordre d'élution sur une colonne de CM cellulose en milieu 8M urée (les chaînes de type non- α sont éluées en premier, suivies des chaînes de type α). Le profil est classique et se retrouve dans le cas d'un grand nombre de globines d'animaux différents. La figure 7B représente la séparation des chaînes x et y de la globine E1. Si on admet l'identification des chaînes de globine par les critères chromatographiques présentés plus haut, la chaîne x est une chaîne de type non- α , la chaîne y est une chaîne de type α . Le profil est anormal, puisque les chaînes de types non- α ont d'habitude - y compris dans d'autres races de souris (MARKS et al., 1966) - une absorption à 280 nm plus grande que les chaînes α , ceci étant dû au fait que les chaînes non- α contiennent plus de tryptophane et de tyrosine que les chaînes α . Il pourrait y avoir une exception à la règle présentée plus haut, ou bien le fait que la chaîne x précipite à ce pH ou se fixe irréversiblement sur la colonne, pourrait expliquer cette anomalie. Pour remédier à cette difficulté et éviter la fixation de la globine sur un adsorbant solide comme la CM cellulose, nous avons chromatographié les globines E1 et E2 en utilisant la méthode à contre-courant.

FIGURE VIII

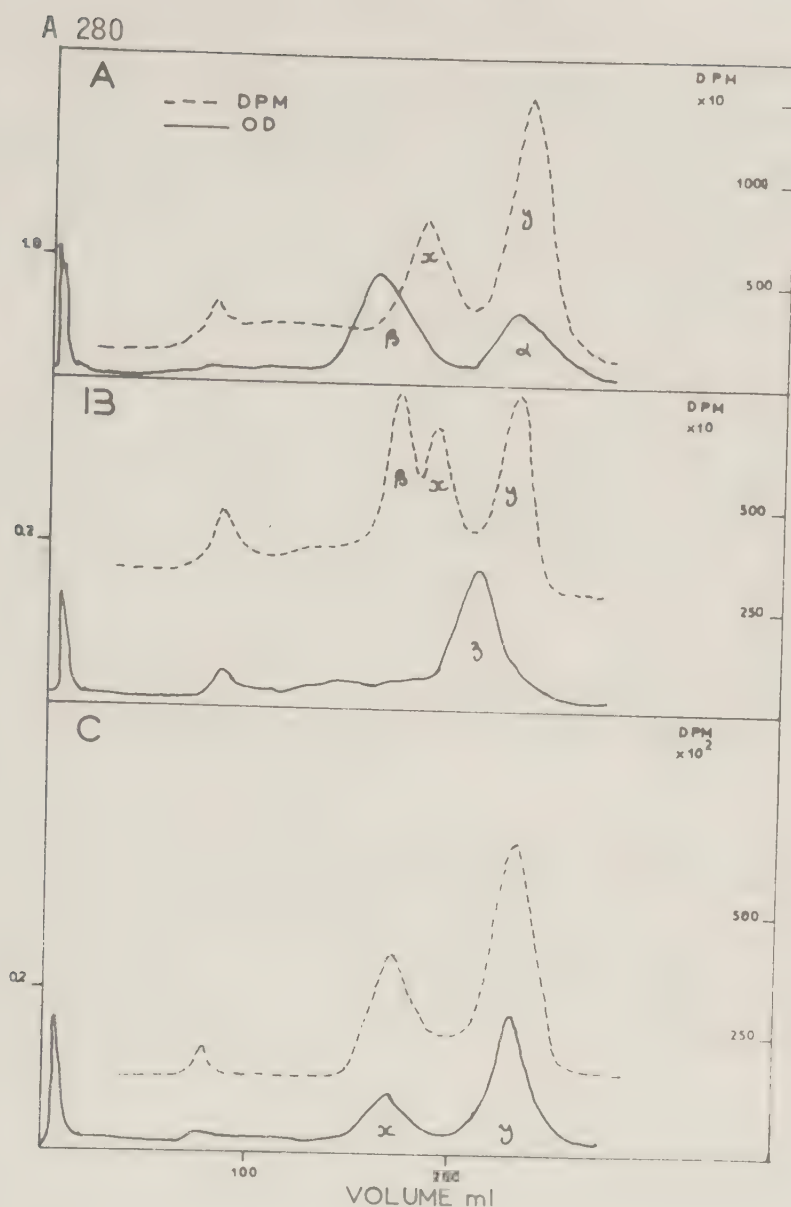


SEPARATION PAR CHROMATOGRAPHIE A CONTRE-COURANT DES GLOBINES

E₁ ET E₂

La séparation des chaînes a été effectuée en 30 transferts.

FIGURE IX



- COMPARAISON ENTRE ELLES DES CHAINES DE GLOBINE -

- A : Chromatographie sur CM-cellulose de la globine E_1 à laquelle on a ajouté un excès de globine A_1 . La globine E_1 est marquée avec la valine tritiée.
- B : Chromatographie sur CM-cellulose de la globine E_2 marquée avec la valine tritiée.
- C : Chromatographie sur CM-cellulose de la globine E_1 marquée avec la valine tritiée.

Dans tous ces graphiques, le trait plein représente la densité optique et le trait pointillé la radioactivité en DPM. Les globines embryonnaires proviennent du fœtus de souris le 13^{ème} jour de gestation.

La figure 8A représente le profil chromatographique de E1 obtenu par chromatographie à contre-courant. Deux chaînes migrant différemment dans la phase supérieure s'y distinguent et elles sont en quantités pondérales équivalentes (après lyophilisation de chacune des chaînes et pesée).

La situation est différente dans la figure 8B, qui représente le profil obtenu pour la globine E2. On assiste à la confirmation du résultat représenté par la figure 7. Il semble n'exister qu'une seule sorte de chaîne présente dans la globine E2. Cette chaîne est de type non- α si l'on s'en rapporte à la règle générale selon laquelle les chaînes non- α migrent davantage dans la phase supérieure que les chaînes α .

De plus la figure 7D représente, elle, le profil chromatographique d'un mélange de globines E1 et E2 ; d'après le profil obtenu il est raisonnable de penser qu'il existe au moins trois chaînes de globines différentes dans l'érythrocyte du sac vitellin.

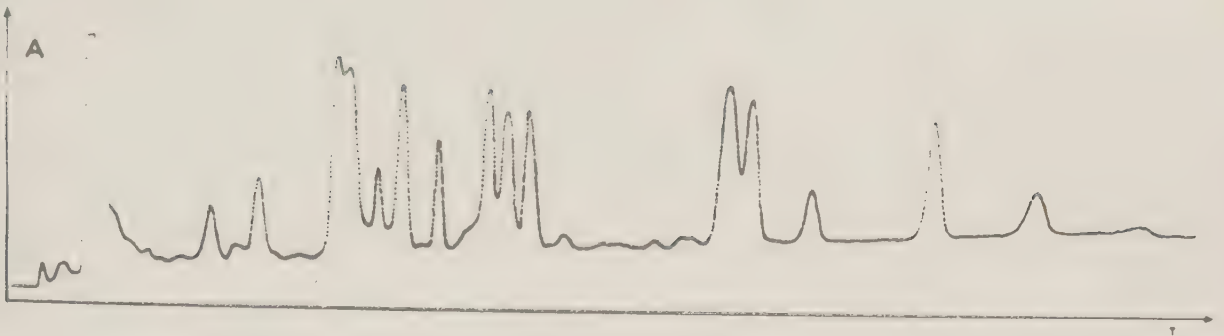
Nous avons ensuite voulu savoir si les chaînes de type α étaient identiques dans les hémoglobines embryonnaires et les hémoglobines adultes comme cela est le cas chez l'homme. Nous avons utilisé des globines E1 et E2 radioactives marquées avec de la valine tritiée obtenue en incubant des réticulocytes du sac vitellin le 13 ème jour de gestation, selon la méthode exposée plus haut.

La figure 9 représente les chromatographies sur CM cellulose de globines E1 et E2 marquées avec la valine tritiée présentes dans les érythrocytes du sac vitellin le 13 ème jour de gestation. La synthèse de E1 le 13 ème jour est encore très active (Fig. 9C), par contre il semble que la synthèse de E2 soit stoppée le 13 ème jour puisque comme le montre la figure 9B, il n'y a pas de radioactivité superposée au profil de densité optique de E2. La radioactivité qui est beaucoup plus faible que celle présentée dans la figure 9C, est sans doute due à la contamination de la globine E2 par les globines A1 et E1.

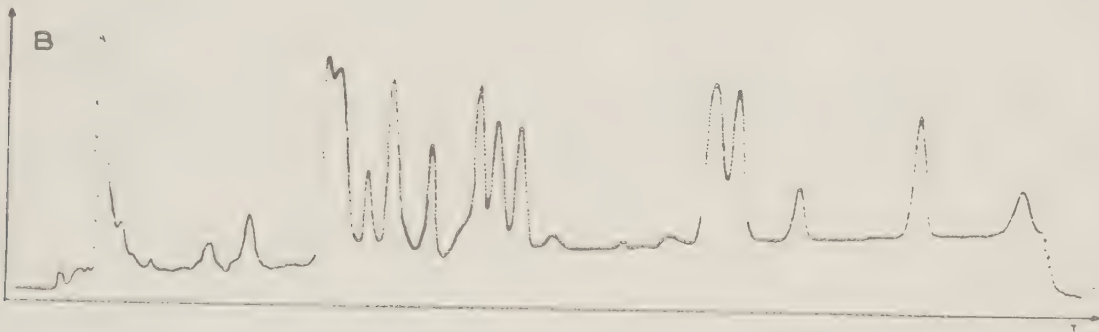
MARKS et al. (1968) ont observé un phénomène similaire sur la souris C57BL où l'une des hémoglobines embryonnaires n'est plus synthétisée à partir du 11 ème jour de gestation.

FIGURE X

A 542



A 542



CHROMATOGRAPHIE DES PEPTIDES OBTENUS PAR DIGESTION TRYPSIQUE DE CHAÎNE α -
D'HEMOGLOBINE DE SOURIS C3H

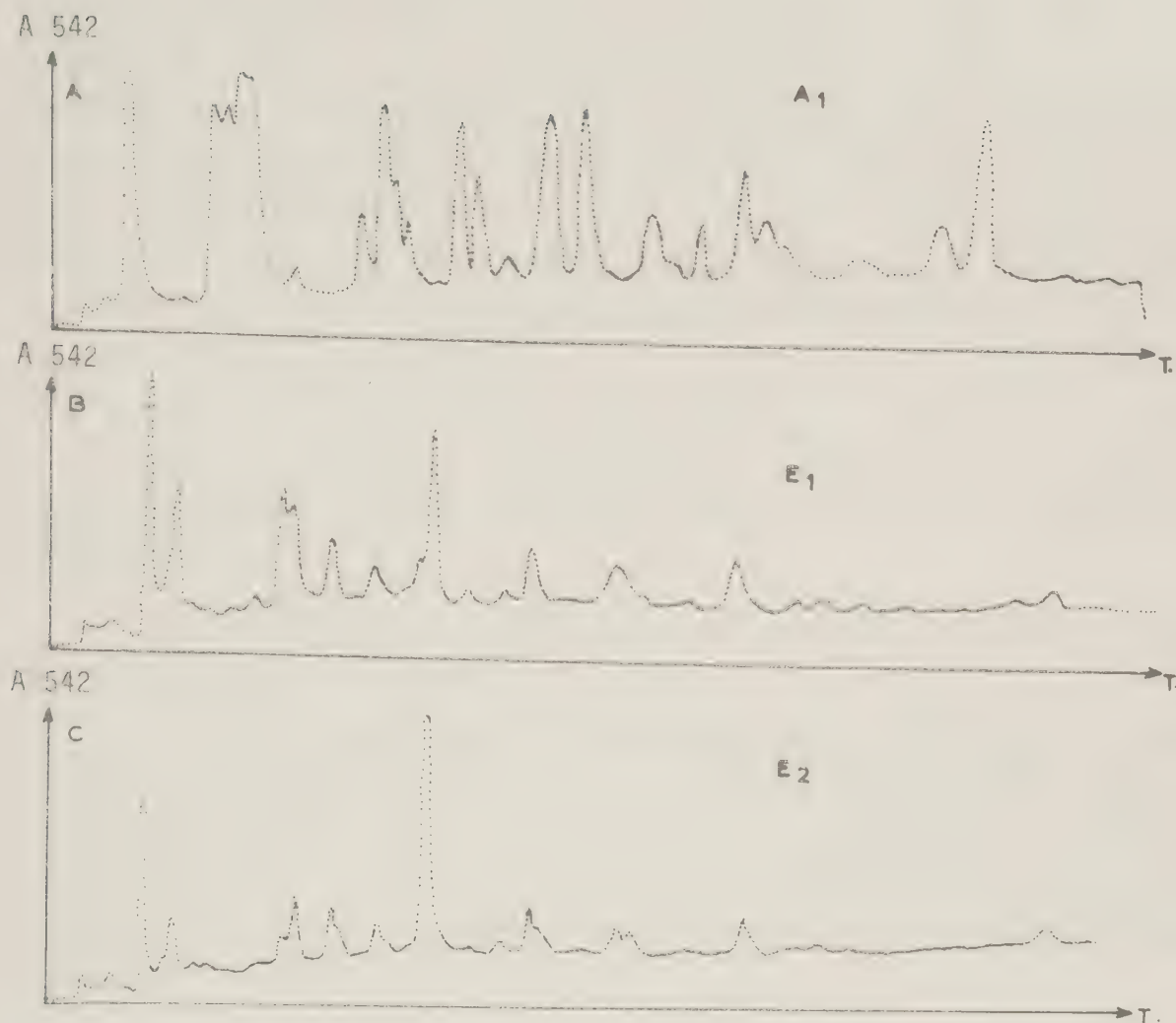
A : Chaîne α d'hémoglobine A₁

B : Chaîne α d'hémoglobine E₁

La chromatographie se fait sur résine DOWEX X-4
selon la méthode de JONES R.T. (1964).

La chaîne de globine E₁ a été isolée à partir d'hémoglobine présente dans
le fœtus le 13^{ème} jour de gestation.

FIGURE XI



CHROMATOGRAPHIE DES PEPTIDES OBTENUS PAR DIGESTION TRYPSIQUE DE CHAINES

NON- α D'HEMOGLOBINE DE SOURIS C3H

- A : Chaîne non- α d'hémoglobine A₁
B : Chaîne non- α d'hémoglobine E₁
C : Chaîne non- α d'hémoglobine E₂

La chromatographie se fait sur résine DOWEX X-4 selon la méthode de R.T. JONES (1964).

Les chaînes de globines E₁ et E₂ ont été isolées à partir d'hémoglobine présente dans le fœtus le 13^{ème} jour de gestation.

Dans la figure 9A est représenté le profil chromatographique de la globine E1 radioactive, mais on a ajouté la globine A1 en excès comme entraîneur. On voit que la radioactivité de la chaîne "y" de E1 se superpose exactement au profil de densité optique de la chaîne α de A1. On peut donc en conclure que chromatographiquement du moins les chaînes de type α sont identiques dans les hémoglobines A1 et E1. Les chaînes non- α sont différentes puisque la radioactivité présente dans la chaîne y de E1 ne se superpose pas au profil de densité optique de la chaîne non- α de A1.

c - Cartes peptidiques

Nous allons dans ce paragraphe tenter de préciser les résultats obtenus précédemment en analysant chacune des chaînes d'hémoglobine mises en évidence auparavant.

Pour cela nous avons réalisé des cartes peptidiques de chacune des chaînes des globines A1, E1 et E2.

La figure 10 représente les cartes peptidiques des chaînes α des hémoglobines E1 et A1 et apporte la preuve de l'unicité des chaînes α dans la souris C3H. Par contre, on voit que les profils des chaînes non- α de l'hémoglobine E1, E2 et A1 sont tous différents entre eux bien qu'il y ait beaucoup d'analogies entre les profils relatifs aux chaînes non- α de l'hémoglobine E1 et E2 (figure 11).

d - Résumé :

A ce stade du travail, la situation se présente donc ainsi. La souris C3H adulte contient deux hémoglobines, A1 et A2, composées chacune de deux chaînes α et de de deux chaînes non- α . Les chaînes α paraissent identiques entre elles. Elles le sont dans le cas de la souris C3H, comme l'ont montré HILSE et POPP (1968) qui ont établi la séquence de la chaîne α en opérant sur la globine provenant d'un mélange d'hémoglobines A1 et A2. Ces auteurs ont aussi montré que la chaîne α commune aux hémoglobines A1 et A2 était en réalité un mélange difficilement résoluble de deux chaînes α différant par trois acides aminés seulement. Cette dualité des chaînes n'apparaît pas dans le profil chromatographique observé dans les expériences que nous avons rapportées jusqu'à présent. Nous nous contentons pour le moment de parler d'une chaîne qui est, ou peut être, le mélange de deux chaînes α de HILSE et POPP.

Dans les érythrocytes du sac vitellin il existe deux hémoglobines embryonnaires que nous avons appelées E1 et E2. E1 est composé de chaînes α et non- α . Les chaînes α de E1, compte tenu de la restriction apportée plus haut, sont identiques aux chaînes α de A1 et A2. L'hémoglobine E2 ne contient, elle, que des chaînes non- α . Le fœtus humain contient lui aussi un tétramère d'un seul type de chaîne d'hémoglobine (HUEHNS et al., 1964). C'est aussi le cas de la souris de souche C 57 BL (MARKS et al., 1966). Il y a encore trop peu de résultats sur les hémoglobines embryonnaires pour dire si c'est un phénomène général ou non. Il serait général, au moins d'une manière temporaire, si la première chaîne de l'hémoglobine synthétisée au cours du développement embryonnaire était habituellement une chaîne non- α .

B) - Hétérogénéité de la chaîne .

a - Souris C3H adultes :

Dans le chapitre précédent nous nous sommes bornés à parler de la chaîne α d'hémoglobine de la souris C3H comme si elle était unique. Or HILSE et POPP (1968) ont montré qu'en réalité chez la souris C3H adulte la chaîne α était un mélange de deux chaînes α , l'une de ces chaînes différant de l'autre par trois substitutions d'acide aminés. L'une de ces chaînes est la chaîne α que l'on trouve dans la souris de souche NB, l'autre est celle que l'on trouve chez la souris de souche C57BL. Nous les appellerons pour les différencier α_{NB} et α_{C57BL} .

En position 25 à partir de l'acide aminé N terminal de la chaîne α_{C57BL} une valine dans la chaîne α_{NB} remplace une glycine, en position 62 une isoleucine remplace une valine et en position 68 une sérine remplace une asparagine. Il y a 70 % de chaîne α_{NB} et 30 % de chaîne α_{C57BL} . Les substitutions d'acides aminés concernent des acides aminés neutres, ces chaînes ne sont pas séparables par électrophorèse. Elles ne le sont pas non plus par les méthodes de chromatographie dont il a été question jusqu'ici.

HILSE et POPP ont mis en évidence l'existence de ces deux chaînes du fait que deux des peptides obtenus par digestion trypsique de la chaîne α ne contiennent pas un nombre entier d'acides aminés. Ils ont résolu chacun de ces deux peptides en deux composantes par chromatographie sur papier ; 70 % de

TABLEAU II

	P ₃₁ NB	P ₃₁ C 57	P ₁₁₅ NB	P ₁₁₅ C 57	α _{NB}	α _{C 57}
Val	2	1	8	9	10	10
Ileu	2	2	1	0	3	2

	Val	Ileu	$\frac{\text{Val}}{\text{Ileu}}$	$\frac{\text{DPM Val}}{\text{DPM Ileu}}$
P ₃₁	2 - x	2	$\frac{2 - x}{2}$	$k \frac{2 - x}{2} = R_1$
P ₁₁₅	8 + x	1 - x	$\frac{8 + x}{1 - x}$	$k \frac{8 + x}{1 - x} = R_2$
α	10	3 - x	$\frac{10}{3 - x}$	$k \frac{10}{3 - x} = R_3$

Détermination des quantités respectives des chaînes α de type αC57 et de type α NB dans les hémoglobines de la souris C3H

$$x = \frac{\alpha \text{ C 57}}{\alpha \text{ NB} + \alpha \text{ C57}}$$

P = peptide.

Le chiffre en indice indique le nombre d'acides aminés par peptide. K représente une constante introduite pour tenir compte des activités spécifiques différentes de chacun des deux acides aminés, valine et isoleucine.

ces peptides ont exactement la séquence des peptides correspondants de la souris NB et 30 % ont exactement la séquence des peptides correspondants de la souris C57BL. Cependant, quand ils ont établi la séquence de la chaîne α de la souris C3H, ils ont opéré sur l'ensemble des hémoglobines A1 et A2

On peut dès lors se demander si les deux types de chaînes α se retrouvent ensemble dans chacune des hémoglobines A1 et A2, ou si au contraire, α NB se retrouve dans l'hémoglobine A1 et α C57 dans l'hémoglobine A2 (on sait que l'hémoglobine A2 représente 20 % du total).

Nous allons donc résoudre ce problème posé par l'existence des deux chaînes α . Le fait que ces chaînes α ne sont pas séparables chromatographiquement nous a conduits à utiliser les traceurs radioactifs. Nous allons expliquer la méthode utilisée puis nous exposerons les résultats obtenus.

Méthodes :

Principes : Dans la chaîne α C57 aussi bien que α NB, une méthionine est en position 31 à partir de l'acide aminé N terminal. Il est donc possible par action du bromure de cyanogène de couper à ce site la chaîne α isolée par chromatographie sur CM cellulose. Si nous partons d'un mélange des deux chaînes α nous nous trouvons après hydrolyse, devant la situation suivante :

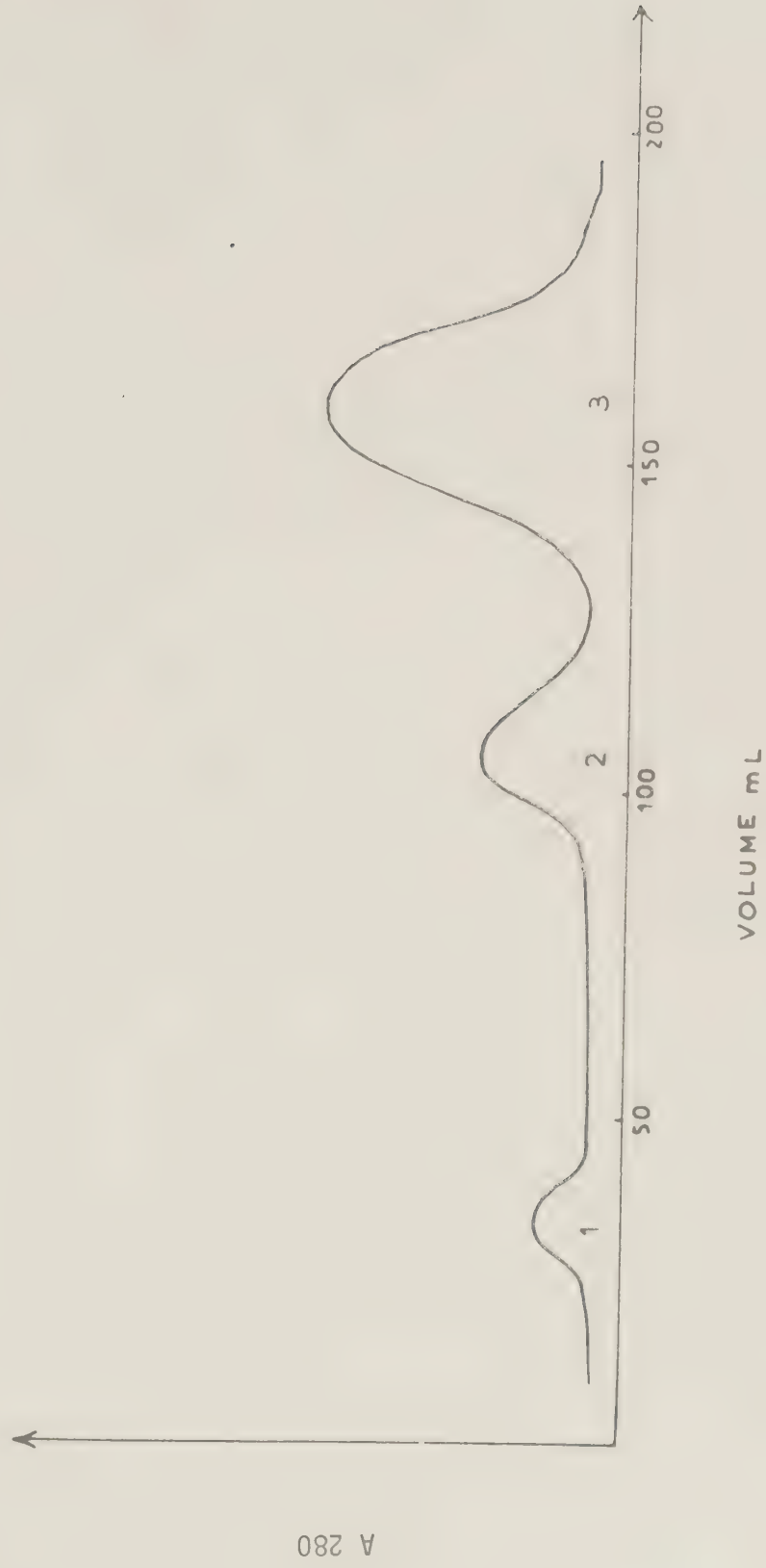
Le mélange des deux chaînes a donné naissance à deux peptides de 31 acides aminés différant, comme le montre le tableau II, par leur contenu en valine ainsi qu'à 2 peptides de 115 acides aminés différant par le nombre des acides aminés valine et isoleucine (voir tableau II) ; on trouve enfin un reste des deux chaînes α initiales non hydrolysées.

La différence de taille entre les peptides eux-mêmes et entre ceux-ci et la chaîne entière rend possible une résolution partielle du mélange sur Sephadex G 100. On obtient le mélange des deux peptides de 31 acides aminés ainsi que le mélange des deux peptides de 115 acides aminés et le mélange des deux chaînes α (tableau II).

Si donc les chaînes α sont uniformément marquées avec de la valine tritiée et de l'isoleucine marquée au ^{14}C , après hydrolyse au bromure de cyanogène des chaînes et séparation des fragments résultant sur Sephadex G 100 la valeur du rapport de la radioactivité du tritium sur la radioactivité du carbone 14 (toutes deux exprimées en désintégrations par minute) pour chacune

FIGURE XII

- SEPARATION DES PEPTIDES OBTENUS PAR COUPEURE DE LA CHAÎNE AU BROMURE DE CYANOGENE, SUR SEPHADEX G-100 -



- 1 : Protéine non coupée au bromure de cyanogène.
- 2 : Peptide de 115 acides aminés.
- 3 : Peptide de 31 acides aminés.

TABLEAU III

Détermination de la valeur de $x = \frac{\alpha \text{ C57}}{\alpha \text{ NR} + \alpha \text{ C57}}$ dans :

		Erythroblastes du foie foetal		
		le 13 ème jour de gestation	le 17 ème jour de gestation	le 18 ème jour de gestation
Réticulocytes des souris C3H adultes				
P31	R1 = 0, 21	R1 = 1, 03	R1 = 0, 28	R1 = 0, 23
P115	R2 = 2, 85	R2 = 8, 8	R2 = 2, 97	R2 = 2, 94
α	R3 = 0, 86	R3 = 3, 55	R3 = 1, 10	R3 = 1, 02
DPM Val				
DPM I leu				
x	x = 0,28 $\pm$ 0,04	x = 0,03 $\pm$ 0,04	x = 0,16 $\pm$ 0, 02	x = 0, 25 $\pm$ 0,05

des deux paires de peptides ainsi que pour les deux chaînes α , sera indicative de la quantité de la chaîne α C57 par rapport à la chaîne α NB.

C'est ce que montre le calcul présenté sur le tableau II.

On voit comment la proportion des deux chaînes est déduite d'un système de trois équations à deux inconnues.

Mode opératoire :

Les réticulocytes sont obtenus par ponction cardiaque de souris C3H traitées à la phénylhydrazine ; on les incube à 37° dans un milieu de Krebs-Ringer modifié contenant tous les acides aminés sauf la valine et l'isoleucine que l'on rajoute sous forme de valine tritiée et d'isoleucine marquée au ^{14}C , après une préincubation d'un demi-heure. L'incubation dure une heure et demi, les réticulocytes sont lavés puis lysés, l'hémoglobine est soumise à une chromatographie sur CM cellulose. On recueille la composante A1 que l'on débarrasse de l'hème ; les chaînes sont séparées sur CM cellulose. La chaîne α est soumise alors à l'hydrolyse par le bromure de cyanogène ; après hydrolyse le mélange résultant est résolu sur Sephadex G 100 équilibré avec l'acide acétique 30 % (Fig. 12).

Chaque pic est collecté séparément et lyophilisé de façon à éliminer l'acide acétique. On dissout ensuite chaque résidu dans 2 ml d'acide acétique 50 % et une partie aliquote de chacune des trois solutions est comptée dans un compteur à scintillation liquide.

Si x représente la valeur du rapport α C57/ α NB + α C57.

On trouve pour x la valeur de $0,28 \pm 0,04$ (Tableau III). On en conclut que l'hémoglobine A1 contient les deux chaînes α NB et α C57 ; le rapport de l'une à l'autre est le même que celui trouvé par HILSE et POPP (1966), par une méthode différente et pour le mélange A1 + A2. On peut donc conclure que les hémoglobines A1 et très probablement aussi A2 contiennent chacune les chaînes α NB et les chaînes α C57, les deux chaînes étant présentes respectivement dans chacune des hémoglobines dans le rapport 70/30. SCHROEDER (1962) a montré que dans l'hémoglobine foetale humaine, les chaînes γ qui sont au nombre de deux et qui se différencient l'une de l'autre par une substitution d'acides aminés, ne restaient pas dans un rapport fixe l'une par rapport à

l'autre au cours de l'ontogénèse. Nous avons étudié le rapport des chaînes de souris C3H, l'une par rapport à l'autre, au cours de l'ontogénèse pour voir s'il variait ou s'il restait constant.

b - Souris C3H au cours de son développement de l'état foetal
à l'état adulte :

Nous avons étudié les chaînes α présentes dans les hémoglobines synthétisées par les cellules érythroblastiques issues du foie le 13^{ème} jour, le 17^{ème} jour et le 18^{ème} jour de gestation.

Les souris, le jour de gestation choisi, sont sacrifiées, l'organe, en l'occurrence le foie, est prélevé sur l'embryon. Les cellules sont mises en suspension dans la solution saline par aspiration douce à travers une seringue, puis lavées par sédimentation, enfin mises dans le milieu d'incubation. Les conditions de l'incubation, des séparations chromatographiques successives, de l'hydrolyse au bromure de cyanogène, de la séparation des peptides et de la mesure de la radioactivité sont les mêmes que celles exposées dans le chapitre "matériel et méthodes", exception faite de la quantité d'hémoglobine présente dans les cellules du foie embryonnaire, trop faible pour pouvoir être suivie sur un enregistreur au cours des chromatographies successives que nécessite la méthode. On rajoute donc, après la lyse, de l'hémoglobine A1 "froide" en excès qui sert d'entraîneur.

Les résultats sont consignés dans le Tableau III qui représente les valeurs de x trouvées les 13^{ème}, 17^{ème} et 18^{ème} jours de gestation.

Le 13^{ème} jour on constate qu'il n'y a pas de chaîne α C57 présente dans l'hémoglobine A1. On ne peut pas dire que la chaîne α C57 soit totalement absente, vu l'incertitude de la méthode. On peut seulement dire que la valeur de x est inférieure à 0,05 alors qu'elle est égale à 0,28 chez la souris adulte. Le 17^{ème} jour la synthèse de α C57 est effective bien que plus faible que chez l'adulte ; $x = 0,16 \pm 0,02$. Le 18^{ème} jour elle atteint pratiquement le niveau adulte.

c - Résumé :

Les premiers résultats concernant l'hétérogénéité de la chaîne chez la souris C3H ont montré que les deux types de chaîne α , α C57 et α NB étaient

présentes dans l'hémoglobine A1 comme dans l'hémoglobine A2 et qu'ils devaient être présents dans chaque hémoglobine dans un rapport identique ou voisin l'un par rapport à l'autre. On peut donc penser que les résultats trouvés pour l'hémoglobine A1 le 13^{ème} jour de gestation dans le foie foetal, sont aussi valables pour l'hémoglobine A2.

Donc pour conclure nous dirons que le 13^{ème} jour de gestation la synthèse de la chaîne α C57 dans les érythrocytes issus du foie foetal est pratiquement nulle et que le 18^{ème} jour elle est semblable à celle observée chez l'adulte.

II - INFLUENCE DU MILIEU SUR LA NATURE DES CHAINES α SYNTHETISEES, ETUDIEES A L'AIDE DE RADIOCHIMERES :

Nous avons montré au chapitre précédent que les érythroblastes issus du foie foetal le 13^{ème} jour de gestation ne fabriquaient pas ou presque pas la chaîne α de type α C57. On sait que chez la souris adulte cette chaîne représente 30 % de l'ensemble des deux chaînes.

Nous allons tirer parti de cette observation pour étudier l'influence de l'environnement de la cellule souche sur l'activation du taux de synthèse de la chaîne α de type α C57.

En effet, si nous injectons à des souris léthalement irradiées les cellules souche présentes dans le foie foetal le 13^{ème} jour de gestation, ces cellules vont donner naissance à des colonies visibles sur la rate des radiochimères, 8 à 10 jours plus tard. Ces radiochimères sont des souris C3H adultes. La rate qui sert de support aux colonies exogènes représente donc un environnement de type adulte, modifié par l'irradiation.

Le but des expériences que nous allons réaliser est de déterminer si le fait de placer des cellules souche, présentes dans le foie du fœtus le 13^{ème} jour de gestation, dans un environnement adulte, a pour effet d'activer dans les érythroblastes issus de ces cellules souche, la synthèse de la chaîne α C57, chaîne qu'ordinairement ces érythroblastes ne synthétisent pas.

Il revient au même de dire que nous voulons tester l'influence de l'environnement sur la cellule souche et les cellules qui en sont issues de façon à voir si à un environnement adulte correspond la synthèse de chaîne d'hémoglobine de type adulte (30 % de α C57 et 70 % d' α NB).

a - Mode opératoire :

Les radiochimères, les cellules souche du foie foetal, les cellules souche présentes dans la rate de la souris C3H adulte s'obtiennent de la manière décrite dans le chapitre "Matériel et Méthodes".

On injecte par piqûre intraveineuse, 0,2 ml d'une solution contenant 10^7 environ cellules nucléées à chacune des souris irradiées utilisées pour chaque expérience.

Le 8 ème jour après l'injection, on sacrifie les radiochimères, on prélève les rates qui sont d'abord découpées en petits fragments, puis les cellules constitutives de chaque fragment sont dispersées et mises en suspension dans la solution saline par aspiration douce à travers une seringue. Les cellules sont ensuite lavées par sédimentation dans la solution saline puis mises dans un milieu d'incubation à 37° contenant de la valine tritiée et de l'isoleucine ^{14}C , pendant 1 h. 30. Après incubation l'hémoglobine est extraite des cellules, les chaînes α de la composante A1 obtenues par chromatographie sur CM cellulose sont soumises à l'hydrolyse par le bromure de cyanogène. Les peptides résultants sont séparés et la radioactivité présente dans chacun d'eux est mesurée. Les méthodes sont celles décrites dans le chapitre "Matériel et Méthodes".

Des résultats du comptage, on déduit par la méthode exposée précédemment dans le même chapitre la valeur de x, c'est-à-dire la proportion de chaîne α de type α C57, synthétisée par les cellules érythroblastiques présentes dans les colonies issues des cellules souche du foie foetal le 13 ème jour de gestation et placées dans un environnement de type adulte.

Cependant il faut pouvoir affirmer que la radioactivité provient de l'hémoglobine synthétisée par les cellules érythroblastiques issues de colonies d'origine exogène.

En effet les cellules de la rate elle-même ou bien encore des cellules provenant des colonies endogènes peuvent incorporer des acides aminés radioactifs dans leurs protéines constitutives, et fausser ainsi les résultats.

Pour tester la première éventualité nous avons incubé des cellules provenant de la rate de souris irradiées léthalement, n'ayant pas reçu par injection intraveineuse de cellules souche exogènes. Comme témoin nous avons pris

TABLEAU IV

	1 er jour	2 ème jour	3 ème jour	4 ème jour	5 ème jour	6 ème jour	7 ème jour	8 ème jour	
A	CPM rate irradiée	3549	253	836	550	527	919	275	282
B	CPM rate Non-irrad.	16135	10127	36350	26190	27730	51055	68750	57910
A/B	22	2.5	2.3	2.1	1.9	1.8	0.4	0.5	

Comparaison de la synthèse des protéines dans les cellules de la rate de souris adultes C3H, irradiées et non-irradiées.

Ces résultats sont ramenés à une même concentration en protéine (densité optique et volume).

CPM = Coups par minute.

des cellules de rate de souris C3H adulte n'ayant pas été irradiées. Nous avons comparé l'incorporation d'acides aminés radioactifs les 1er, 2^{ème} .. 8^{èmes} jours après irradiation. Les résultats sont consignés dans le Tableau IV.

On voit qu'au bout de 5 jours la radioactivité présente dans une rate de souris léthalement irradiée est égale au 2/100 de la radioactivité incorporée dans une rate de souris adulte normale non irradiée. Comme la radioactivité incorporée par une rate de radiochimère ayant reçu 10×10^6 cellules nucléées est plus importante que celle incorporée par une rate normale, la radioactivité provenant de cellules de la rate irradiée est donc négligeable devant celle incorporée par les cellules des colonies exogènes.

Nous avons ensuite testé l'existence de colonies d'origine endogène chez les souris léthalement irradiées, c'est-à-dire celles qui apparaissent sur la rate en l'absence de toute injection de cellules souche exogène. Pour cela nous avons sacrifié des souris de souche C3H huit jours après qu'elles aient subi une irradiation d'une intensité de 1100 R et nous avons compté les colonies après révélation des rates pendant deux heures dans un mélange acide picrique-formol. Sur un total de 60 rates nous avons trouvé 0,2 colonie endogène par rate, ce qui est très faible comparé aux 100 colonies exogènes supposées présentes dans les radiochimères utilisées pour ces expériences.

On peut donc affirmer que la radioactivité décelée dans l'hémoglobine provient exclusivement des cellules érythroblastiques présentes dans les colonies d'origine exogène.

La valeur de x que l'on trouve après comptage est donc bien une valeur représentative de la quantité de chaîne α C57 synthétisée par les cellules érythroblastiques issues des cellules souche du foie de fœtus le 13^{ème} jour de gestation.

b - Résultats :

Nous injectons des cellules souche provenant du foie fœtal le 13^{ème} jour de gestation à des souris irradiées et nous mesurons la valeur de x selon la méthode exposée au chapitre précédent.

Nous allons nous trouver en présence de deux cas possibles : ou bien la valeur de x trouvée est $\leq 0,05$; dans ce cas nous pouvons conclure que

TABLEAU V

Détermination de la valeur de $x = \frac{\alpha \text{ C57}}{\alpha \text{ NB} + \alpha \text{ C57}}$ dans les hémoglobines

synthétisée par les colonies présentes dans des radiochimères.

		A		B		C		D		
DPM Val	R1 =	0, 29 0, 30	:	R1 =	0,30 0,55	:	R1 =	0, 29 0, 23	R1 =	0, 29 0, 26
	R2 =	2, 30 2, 34	:	R2 =	2,48 4,4	:	R2 =	3, 3 2, 68	R2 =	2, 35 2, 10
	R3 =	1, 0 1, 06	:	R3 =	1,04 2,0	:	R3 =	1, 17 1, 20	R3 =	0, 95 0, 85
		x = 0,00+0,02		x = 0,00+0,05		x = 0,20+0,02		x = 0,01+0,02		

A : Cellules-souche provenant de la rate de souris C3H adulte.

B : Cellules-souche provenant du foie foetal la 13 ème jour de gestation.

C : Cellules-souche provenant de la rate de souris C3H adulte (les radiochimères ont reçu des injections de sérum provenant de souris C3H adultes).

D : Cellules-souche provenant de la rate de souris C3H adultes (radiochimères ont reçu des injections de sérum provenant de souris C3H adultes léthalement irradiées).

R1, R2, R3 : rapports définis dans le tableau II.

Ces chiffres sont les résultats de deux expériences indépendantes portant chacune sur un groupe de 8 souris réceptrices.

l'environnement de type adulte n'a pas d'influence sur le type d'hémoglobine synthétisée par les érythroblastes issus des cellules souche de type fœtal. Ou bien nous trouvons comme valeur de x $0,05 < x < 0,3$ et alors on peut dire que l'influence de l'environnement s'exerce sur le type de chaîne α synthétisée. En fait on trouve $x < 0,05$ (Résultat de deux expériences). (Tableau V). On peut donc considérer que c'est la première hypothèse qui est la bonne, à condition toutefois qu'ait été réalisée l'expérience témoin suivante : mesurer par la même méthode la valeur de x trouvée dans l'hémoglobine synthétisée par des cellules souche adultes, injectées à des souris irradiées adultes et vérifier que cette valeur de x est bien égale à 0,30 (valeur trouvée pour le rapport des chaînes α dans les hémoglobines adultes).

Pour réaliser cette expérience on injecte à des souris irradiées des cellules souche provenant de la rate d'une souris C3H adulte non irradiée. La valeur de x trouvée est dans ce cas encore $x < 0,05$.

Cette valeur de x n'est pas celle à laquelle on s'attendait, puisque l'on sait que les érythroblastes de type adulte synthétisent les deux chaînes α de type α C57 et α NB.

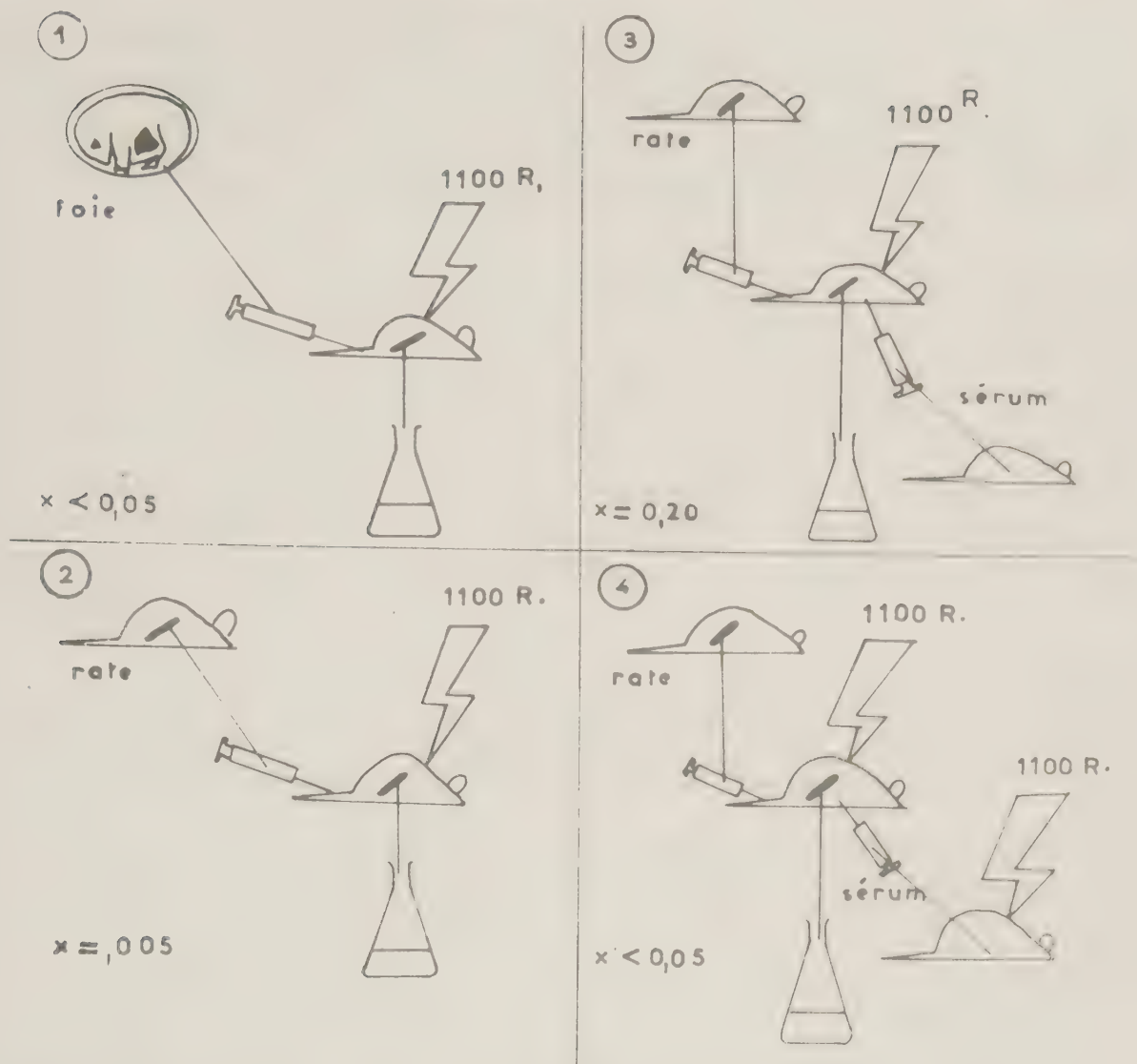
Ainsi le milieu intérieur d'une souris adulte irradiée, non seulement est incapable d'induire dans des cellules érythropoïétiques d'origine fœtale une synthèse de chaîne α d'hémoglobine adulte, mais il est encore incapable d'induire une telle synthèse dans des cellules érythropoïétique d'origine adulte.

L'irradiation apparaît comme responsable de l'arrêt de la synthèse de la chaîne α C57 dans les cellules d'origine adulte.

L'irradiation a pour effet de supprimer le compartiment des cellules souche. Or on sait que les cellules souche sont multifonctionnelles, c'est-à-dire qu'elles initient aussi bien des lignées érythroblastiques que des lignées granuloblastiques ou lymphoblastiques. Puisque l'irradiation létale fait disparaître l'ensemble de ces lignées cellulaires, après irradiation, disparaissent de la circulation sanguine les produits normalement synthétisés par ces cellules. D'autres modifications du sérum pourraient également intervenir.

Si la modification que le milieu intérieur de la souris a subi par suite de l'irradiation est responsable du fait que ce milieu intérieur "adulte" n'a pas induit ou a réprimé dans les lignées érythropoïétiques d'origine

FIGURE XIII



DESCRIPTION DES EXPERIENCES EFFECTUEES SUR LES RADIOCHIMERES

- 1 - Hémoglobine synthétisée par les érythroblastes présents dans les colonies issues de cellules-souche provenant du foie fœtal le 12 ème jour de gestation et injectées à des souris irradiées adultes.
- 2 - Hémoglobine synthétisée par les érythroblastes présents dans les colonies issues de cellule-souche provenant de la rate de souris adultes injectées à des souris irradiées adultes.
- 3 - Hémoglobine synthétisée par les érythroblastes présents dans les colonies issues de cellules-souche provenant de la rate de souris adultes injectées à des souris irradiées adultes ayant reçu chaque jour des injections de sérum provenant de souris adultes non-irradiées.
- 4 - Hémoglobine synthétisée par les érythroblastes présents dans les colonies issues de cellules-souche provenant de la rate de souris adultes injectées à des souris irradiées adultes ayant reçu chaque jour des injections de sérum provenant de souris adultes irradiées.

adulte la synthèse de la seconde chaîne α d'hémoglobine, il est possible que l'on puisse restituer à la souris irradiée les caractéristiques normales de son milieu intérieur en lui injectant du sérum provenant de souris adultes non irradiées. Pour tester cette possibilité, nous avons réalisé l'expérience suivante.

Nous avons injecté 10^7 cellules nucléées provenant de la rate de souris adulte C3H à chaque souris d'un groupe de 8 souris irradiées à 1100 R. Nous avons ensuite injecté chaque jour pendant 8 jours dans le péritoine de ces radiochimères contenant des cellules souche provenant de rate de souris adulte normale, 0,2 ml de sérum de souris C3H adulte non irradiée (la masse sanguine d'une souris représente un volume de 2 ml). Huit jours après la première injection, on sacrifie les radiochimères, on prélève la rate et on opère comme dans les expériences précédentes.

Nous avons trouvé alors une valeur de x égale à 0,2 qui est proche de la valeur présente chez la souris C3H. Cette valeur de x représente le résultat de 2 expériences (Tabl. V) ayant porté chacune sur 8 souris.

Ces expériences montrent qu'il existe dans le sérum un facteur responsable soit directement, soit indirectement (par effet sur l'environnement) de l'activation de la synthèse de la chaîne α de type α C57. Cependant, ce résultat n'est valable que s'il est possible de montrer que l'injection de sérum de souris adulte irradiée n'est pas capable de produire le même résultat. L'expérience destinée à ce contrôle est la même que la précédente, excepté que nous injectons chaque jour pendant 8 jours dans le péritoine de radiochimères contenant des cellules souche provenant de la rate de souris C3H normale 0,2 ml de sérum de souris C3H adulte ayant reçu une irradiation létale de 1100 R. Nous trouvons alors une valeur de $x < 0,05$, cette valeur représentant le résultat de deux expériences, confirme l'hypothèse émise précédemment (Fig. 13).

c - Résumé :

Nous avons constaté que la chaîne α d'hémoglobine synthétisée par les érythroblastes issus des cellules souche injectées à ces souris C3H léthalement irradiées, ne présentait pas l'hétérogénéité constatée chez les érythroblastes présents chez la souris C3H adulte non irradiée. Chez les radiochimères, seule la chaîne α de type NB est synthétisée.

Si tous les jours pendant 8 jours on injecte à ces radiochimères du sérum provenant de souris adultes non irradiées, on constate l'activation de la synthèse de la chaîne α C57. Si par contre on injecte à ces radiochimères tous les jours pendant 8 jours du sérum provenant de souris C3H léthalement irradiées, nous n'observons aucune activation de la synthèse de la chaîne α de type α C57.

DISCUSSION

Nous allons dans ce chapitre examiner les résultats présentés dans le chapitre précédent.

Si l'on reprend la figure 1 et que l'on tente de relier les différents types d'hémoglobine avec les différentes populations de cellules souche qui se succèdent au cours de l'ontogenèse, on voit que la population de cellules souche présente dans les îlots sanguins initie un différon érythroblastique responsable de la synthèse des hémoglobines E1 et E2.

L'hémoglobine E1 est composée de deux chaînes α et de deux chaînes non- α , et l'hémoglobine E2 est composée de quatre chaînes non- α identiques entre elles et différentes des chaînes non- α de l'hémoglobine E1. La synthèse de E1 commence le 9^{ème} jour de gestation et s'arrête la 14^{ème} jour de gestation au plus tard. Le 13^{ème} jour et sans doute dès le 11^{ème} jour, par analogie avec la situation mise en évidence chez la souris C57 BL (MARKS et al., 1968), il n'y a plus de synthèse d'hémoglobine E2.

Dans le foie on ne constate pas la synthèse d'hémoglobines différentes des hémoglobines embryonnaire ou adultes, tout au moins en quantités détectables par les techniques utilisées.

Ces données n'existaient pas encore pour la souris de souche C3H. Sur cette souche avait été réalisé la séquence de la chaîne α par HILSE et POPP (1968) ainsi que la séquence partielle d'une chaîne non- α (chaîne non de l'hémoglobine A1, GILMAN et al. (1970). Cependant on constate que l'hématopoïèse chez la souris C3H est très semblable à celle observée par MARKS et ses collaborateurs pour une autre souche de souris, la souris de souche C57 BL.

Ces auteurs, au cours du développement de cette souche de souris n'observent que des hémoglobines de type embryonnaires et des hémoglobines adultes. Il semble donc que ce soit une caractéristique valable pour toutes les souches de souris.

Un problème reste à résoudre cependant : les érythrocytes en provenance du foie foetal synthétisent-ils des hémoglobines de type adulte seulement, ou bien y-t-il synthèse d'hémoglobines adultes et embryonnaires ? Il est impossible d'après nos propres données, de fournir une réponse nette à cette question.

Il existe néanmoins pour la souris C57 BL des données permettant de préciser le problème. La souris C57 BL possède trois hémoglobines embryonnaires et une hémoglobine adulte (MARKS et al., 1966). KOWACS et al. (1967) ont séparé par centrifugation la population d'érythrocytes présents dans la circulation sanguine le 14^{ème} et le 15^{ème} jour de gestation en deux sous-populations, l'une composée presque exclusivement de 97 % d'érythrocytes non nucléés en provenance du foie foetal et l'autre composée d'un mélange d'érythrocytes en provenance du foie foetal et du sac vitellin. L'hémoglobine présente dans la première population était exclusivement de type adulte, il n'y avait pas présence d'hémoglobine de type embryonnaire dans les érythrocytes en provenance du foie foetal. Ces auteurs ont de plus incubé des érythroblastes provenant du foie foetal le 14^{ème} et le 15^{ème} jour de gestation avec des acides aminés radioactifs. Ils n'ont alors constaté aucune synthèse d'hémoglobine embryonnaire ni aucune radioactivité autre que celle présente dans l'hémoglobine adulte. Il semble donc raisonnable de penser que chez la souris C57 BL les érythrocytes en provenance du foie foetal ne contiennent que de l'hémoglobine de type adulte et ne synthétisent pas d'hémoglobine embryonnaire, du moins en quantité décelable par les méthodes utilisées. Comme il s'agit d'une propriété fondamentale de l'érythropoïèse, il semble possible de la généraliser pour toutes les souches de souris et par conséquent la souche C3H.

Il est raisonnable de penser que les érythrocytes du sac vitellin de la souris C3H ne synthétisent que des hémoglobines embryonnaires E1 et E2 que les érythrocytes du foie foetal ne synthétisent que des hémoglobines de type adulte A1 et A2. Cependant le 13^{ème} jour et le 14^{ème} jour de gestation l'hémoglobine A2 est synthétisée en plus grande quantité que l'hémoglobine A1, la situation se renverse le 15^{ème} jour et le 16^{ème} jour les hémoglobines A1 et

A2 sont synthétisées dans des proportions proches de celles caractérisant l'état adulte.

D'après les résultats présentés par nous-mêmes et par MARKS et son équipe, les types d'hémoglobine synthétisées par les cellules érythroblastiques semblent différer selon que ces cellules sont issues de cellules souches situées dans les îlots sanguins, ou qu'elles sont issues de cellules souche situées dans le foie foetal, la rate ou la moelle osseuse.

Nous avons vu dans le chapitre précédent que la chaîne α des hémoglobines A1 et A2 de la souris C3H adulte étaient en réalité un mélange de deux chaînes α , l'une de type α NB et l'autre de type α C57. Cette hétérogénéité de la chaîne α n'existe pas chez la souris C 57BL, par contre on la retrouve dans une autre souche de souris, la souris BALB/C. Ces résultats ressemblent à ceux qui ont été rapportés par von EHRENSTEIN (1966) pour la chaîne α d'hémoglobine de lapin, par KILMARTIN et CLEGG (1967) pour les chaînes α d'hémoglobine de cheval et par HUISMAN et al. (1967) pour la chaîne α d'hémoglobine de porc, ainsi que par SCHROEDER et al. (1967) pour la chaîne γ d'hémoglobine foetale humaine. On peut les expliquer en postulant soit une multiplicité génique (polymorphisme ou duplication de gènes), soit une ambiguïté à la traduction du matériel génétique. Von EHRENSTEIN en 1966 explique la multiplicité des chaînes α d'hémoglobine du lapin par l'existence d'ambiguïté au niveau de la traduction de l'ARN messenger. Pour une catégorie de codons de cet ARN messenger, la proportion d'erreurs à la traduction est négligeable. Une autre catégorie de codons de l'ARN messenger est traduite au contraire avec une proportion d'erreurs non négligeable. Il en résulterait une multiplicité de chaînes polypeptidiques synthétisées à partir d'un seul gène. SCHROEDER et al. (1967) pour les chaînes γ d'hémoglobine foetale humaine, SCHAPIRA et al. (1968) ont montré pour les chaînes α d'hémoglobine de lapin, qui étaient à l'origine de l'hypothèse formulée par von EHRENSTEIN, que cette hypothèse ne pouvait être retenue ; HUISMAN et al. (1967) pour les chaînes α de porc, HILSE et POPP (1968) pour les chaînes α de souris de la souche C3H, ont montré qu'il s'agissait d'une duplication de gènes.

Ces derniers ont montré que la peptide P 115 qui représente 30 % du mélange et qui contient en position 62 uniquement de la valine, ne contenait aussi que de l'asparigine en position 68, et que le peptide P115 qui repré-

sentait 70 % du mélange, ne contenait que de l'isoleucine en position 62, et de la sérine en position 68. Si l'hétérogénéité de ce peptide dans la chaîne de la souris C3H était due à une ambiguïté de la traduction, ce peptide P 115 serait apparu sous quatre formes différentes. Or, HILSE et POPP n'en ont trouvé que deux.

De nos données, on peut peut-être tirer quelques arguments supplémentaires contre l'hypothèse de von EHRENSTEIN. Dans nos expériences nous n'avons étudié que deux acides aminés, en position 25 et 62 à partir de l'acide aminé N-terminal. Pour chacune de nos expériences de double marquage, en résolvant le système de 3 équations à 2 inconnues faisant intervenir uniquement les deux chaînes α de type NB et C57, on obtient une valeur de x identique pour les peptides P 31, P 115 et pour la protéine ; ce qui n'aurait pas été le cas si toutes les permutations étaient possibles pour les acides aminés présents aux sites 25 et 62 à partir de l'acide aminé N-terminal.

De même le 13 ème jour de gestation nous avons trouvé pour x une valeur voisine de zéro, ce qui ne fait intervenir qu'un seul type de chaîne, la chaîne α NB. Nous n'avons donc pas dans nos expériences constaté l'hétérogénéité à laquelle on aurait pu s'attendre d'après l'hypothèse de von EHRENSTEIN.

L'observation la plus intéressante de cette partie du travail est cependant le fait que le 13 ème jour de gestation, la synthèse de la chaîne de type α C57 soit pratiquement nulle et qu'elle tende vers la situation trouvée chez la souris adulte le 18 ème jour de gestation.

Dans nos expériences, c'est la synthèse d'hémoglobine que l'on observe. Nous ne pouvons donc décider à quel niveau se situe l'absence de synthèse de la chaîne α C57 chez le fœtus de la souris C3H le 13 ème jour de gestation. Est-ce au niveau de la transcription du message génétique, ou au niveau de sa traduction ?

Une manière de résoudre ce problème serait la suivante, inspirée par les expériences publiées par WILLIAMSON et al. (1973). Ces expériences elles-mêmes utilisent la méthode de GURDON et de ses collaborateurs (LANE et al. (1971), MOAR et al. (1971). On injecte à des oeufs de *Xenopus* l'ARN messager présent dans les érythroblastes du foie fœtal le 13 ème jour de gestation. Si le blocage de la synthèse de la chaîne α C57, chez le fœtus de la souris C3H le 13 ème

jour de gestation, se situe au niveau de la traduction, l'ARN messager responsable de la synthèse de la chaîne α C57 est alors présent, mais seul l'ARN messager qui gouverne la synthèse de la chaîne α NB est traduit.

Si ce blocage est dû à la présence dans les érythroblastes d'un facteur qui inhibe la traduction ou à la présence d'un facteur qui active l'inhibiteur, ces facteurs inhibiteurs ou activateurs supposés seraient absents chez l'oeuf de *Xenopus*, pour les deux ARN messagers de la synthèse des chaînes α NB et α C57. Or, WILLIAMSON et al. (1973) ont montré que l'ARN messager présent dans les réticulocytes de la souris, injectés à des oeufs de *Xenopus*, était traduit en hémoglobine par le système de traduction de l'oeuf de *Xenopus*. On peut donc supposer que si les deux ARN messagers des chaînes α NB et α C57 sont présents dans le messenger que l'on injecte à l'oeuf de *Xenopus*, ils y seront traduits et on constatera la synthèse des chaînes α NB et α C57. Si tel était le cas, on pourrait émettre l'hypothèse que l'arrêt de la synthèse de la chaîne α C57 dans les érythroblastes du foie foetal, le 13 ème jour de gestation, se situe au niveau de la traduction du messenger. Dans le cas contraire on ne pourrait pas statuer sur l'hypothèse inverse sans examiner de près la stabilité relative des messagers des chaînes α NB et α C57.

Dans un autre domaine il est tentant de relier l'activation de la chaîne α C57 à l'érythropoïèse observée dans les érythrocytes du foie foetal.

On a vu que le 18 ème jour de gestation, la synthèse de chaîne α de type α C57 était presque identique à la synthèse observée chez les souris adulte C3H ; on peut alors envisager deux possibilités : ou bien deux populations de cellules souche se succèdent, discontinues, différentes par le type d'hémoglobine synthétisée ; ou bien il n'y a qu'une seule population qui se succède à elle-même, caractérisée par une variation continue du type d'hémoglobine synthétisé.

Si maintenant nous nous intéressons à la nature - hétérogène ou non - de la chaîne α d'hémoglobine synthétisée par les radiochimères, un point que nous devons considérer concerne l'incubation.

Nous avons vu dans le chapitre précédent que 8 jours après injection des cellules souche à une souris irradiée léthalement, les radiochimères étaient sacrifiées ; on prélevait la rate et les cellules étaient mises en incubation dans un milieu totalement synthétique contenant des acides aminés radioactifs,

pendant 1 heure 30 à 37° C. L'incubation ne modifie pas les résultats puisque des témoins réalisés sur des cellules érythroblastiques de rate provenant de souris C3H adultes non irradiées nous ont donné comme valeur de x , $x = 0,30$ (valeur trouvée dans la souris C3H adulte normale).

L'activation de la synthèse de la chaîne α C57 apparaît donc comme irréversible dans les limites de temps de l'expérience. Cependant l'incubation est suffisamment courte pour que les résultats trouvés puissent être la conséquence de l'existence au moment de l'incubation, d'un pool dans les cellules soit d'ARN messager préformé de la chaîne α C57, soit du ou des facteurs responsables du déblocage de la traduction d'ARN messager de la chaîne α C57. Pendant l'incubation de 1 heure 30, il y aurait utilisation de ce "pool" préformé.

Le résultat le plus intéressant de ce travail est cependant que nous sommes maintenant capables d'inactiver puis de réactiver spécifiquement la synthèse d'une chaîne d'hémoglobine.

On peut émettre l'hypothèse qu'il existe dans le sérum de la souris C3H adulte non irradiée un facteur, ou plusieurs, capables directement ou indirectement d'activer la synthèse de la chaîne α d'hémoglobine de type α C57.

Le 13^{ème} jour de gestation ce facteur, d'après l'hypothèse, est absent du sérum de fœtus. Il est cependant possible qu'il y soit présent, mais que les cellules ne soient pas en état d'y répondre. En effet, VOGEL et al. (1970) ont constaté qu'il y avait proportionnalité entre l'âge des cellules souche provenant du foie fœtal (12^{ème}, 13^{ème}, 15^{ème} jour de gestation) et le moment où ces cellules souche, après injection, commençaient à se développer sur la rate de souris irradiées léthalement.

Lorsque les cellules souches ont été prélevées sur des fœtus le 12^{ème} jour de gestation, il y a 3 jours de latence avant qu'elles ne se développent sur la rate de souris irradiée (qui représente un environnement de type adulte). Le 13^{ème} jour de gestation ce temps de latence n'est plus que de 2 jours et il est identique au temps de latence observé pour des cellules souche de type adulte le 15^{ème} jour de gestation. VOGEL et al. (1970) ont alors émis l'hypothèse d'une "horloge biologique". Cette hypothèse impliquerait que le facteur responsable de la synthèse de la chaîne α C57 soit présent dans le sérum de fœtus de la souris C3H le 13^{ème} jour de gestation mais que les cellules érythroblastiques manquent de "maturité" pour l'utiliser.

TABLEAU VI

COMPATIBILITE DES HYPOTHESES AVEC LES RESULTATS OBTENUS

Sérum de souris C3H adulte	Sérum de radiochimère C3H	Sérum foetus de souris C3H le 13 ^e jour de gestation	Sérum de radiochimère ayant reçu des injections de souris C3H adulte irradiée	Compatibilité de: avec les résultats obtenus
0	0	0	00	COMPATIBLE
▽	▽	▽	▽▽	INCOMPATIBLE

- 0 Présence dans le sérum de la souris C3H d'un facteur activant la synthèse de la chaîne de type C57
- 0 Absence de ce facteur sans le sérum.
- ▽ Présence dans le sérum de la souris C3H ou du foetus d'un facteur inhibant la synthèse de la chaîne de type C57.
- ▽ Absence de ce facteur dans le sérum.

Cependant l'hypothèse de la présence dans le sérum d'une souris adulte normale d'un facteur activant la synthèse de la chaîne α de type α C57, n'est pas la seule hypothèse possible. Il pourrait y avoir, au contraire, absence chez la souris C3H adulte d'un ou de plusieurs facteurs inhibant la synthèse de la chaîne α de type α C57. Ce ou ces facteurs seraient présents dans le foie foetal le 13 ème jour de gestation, disparaîtraient le 18 ème jour de gestation et réapparaîtraient dans les souris soumises à l'irradiation (Tableau VI)

Considérons le deuxième cas de plus près : si le ou les facteurs inhibiteurs sont absents du sérum de la souris normale (synthèse de la chaîne de type C57), ils sont présents dans le sérum des radiochimères (absence de synthèse de la chaîne α de type α C57 dans les hémoglobines synthétisées par les cellules hématopoiétiques présentes dans les colonies). Donc le ou les facteurs inhibiteurs sont toujours présents, également, dans des radiochimères ayant reçu des injections de sérum de souris normales non irradiées chaque jour pendant huit jours, à moins que ce sérum ne contienne un facteur inhibant l'inhibiteur. Si nous négligeons cette possibilité trop compliquée pour être retenue de prime abord, la présence d'un facteur inhibiteur dans les radiochimères devrait empêcher toute synthèse de la chaîne α de type α C57 dans les hémoglobines synthétisées par les cellules hématopoiétiques présentes dans les colonies de radiochimères ayant reçu des injections de sérum adulte normal. Or c'est le contraire que l'on constate puisqu'il y a synthèse de la chaîne α de type α C57 à un taux légèrement moindre que dans la souris adulte sans doute, mais très significatif cependant. Seul le premier cas présenté dans le tableau est donc retenu comme plausible. Nous maintenons donc qu'il existe probablement dans le sérum de la souris adulte non irradiée un ou plusieurs facteurs qui activent la synthèse de la chaîne α de type α C57.

Une manière de tester cette hypothèse serait la suivante : Admettons que nous injectons à une souris irradiée des cellules souche en provenance du foie foetal le 13 ème jour de gestation (Les cellules hématopoiétiques ne synthétisent pas la chaîne de type α C57) et que nous injectons du sérum de souris adulte non irradiée chaque jour pendant 8 jours à ces radiochimères. Selon le premier cas du tableau VI nous devons constater la synthèse de la chaîne α C57 dans les cellules hématopoiétiques présentes dans les colonies issues des cellules souche présentes dans le foie foetal le 13 ème jour de gestation,

une synthèse d'ailleurs identique à celle observée chez des radiochimères ayant reçu des cellules souche de la rate de souris adulte et injectée chaque jour pendant 8 jours avec du sérum de souris C3H adulte non irradiée. En effet selon l'hypothèse le sérum de la souris normale contient le ou les facteurs activateurs que l'on injecte à une radiochimère, laquelle ne les contient pas. Le ou les facteurs activateurs sont présents dans la radiochimère qui a reçu des injections de sérum de souris adulte non irradiée. On doit donc constater une même synthèse de la chaîne α de type α C57 dans les hémoglobines synthétisées par les cellules hématopoiétiques présentes dans les colonies, que ces colonies soient issues de cellules souche provenant du foie foetal le 13 ème jour de gestation, ou qu'elles proviennent de la rate adulte.

Si nous constatons des différences entre ces deux cas, il faudrait alors envisager des hypothèses plus complexes.

Actuellement c'est souvent au niveau du phénotype, non pas au niveau du génotype, que l'on étudie la différenciation cellulaire dans les cellules eukaryotes. Quand par exemple on parle de la différenciation des gènes relatifs à l'hémoglobine, au cours de l'ontogénèse dans les cellules érythropoïétiques, c'est la synthèse, ou l'arrêt de la synthèse des différentes chaînes d'hémoglobine que l'on observe.

On doit alors se poser la question dont il a déjà été fait état plus haut : A quel niveau de l'expression génique se situe l'arrêt de la synthèse de la chaîne α C57 chez la radiochimère, puis la réactivation de cette synthèse après injection de sérum à cette même radiochimère ? Est-ce au niveau de la transcription du gène ou au niveau de sa traduction ?

Nous pourrions utiliser la méthode exposée plus haut, à savoir injecter à des oeufs de *Xenopus* l'ARN messager présent dans les colonies trouvées sur la rate des radiochimères.

Malheureusement ces colonies ne sont pas toutes érythroblastiques, 55 % sont érythroblastiques, 35 % granulocytiques, 3 % mégacaryocytiques et 7 % contiennent les trois types de cellules (BRECHER et al. (1967). Il n'est donc pas douteux que l'ARN ainsi injecté à l'oeuf de *Xenopus* gouvernerait chez celui-ci la synthèse d'un grand nombre de chaînes polypeptidiques différentes. La méthode utilisant les traceurs radioactifs, la valine et l'isoleucine et

qui permet de distinguer entre les deux chaînes α d'hémoglobine pourrait ne plus s'appliquer dans ce cas, vu le faible taux de synthèse d'hémoglobine d'une part et la contamination possible des chaînes α d'hémoglobine par d'autres protéines d'autre part, entraînant ainsi un manque de précision des résultats.

Une autre façon de parvenir à ce résultat pourrait être la suivante. Nous réalisons un hybride de la souris C3H et de la souris C57 (la souris C57 ne possède qu'une seule chaîne α d'hémoglobine, la chaîne α C57). Ainsi nous augmentons le taux de synthèse de la chaîne α C57. Puis nous injectons les cellules souche présentes dans la rate de la souris hybride adulte à une souris C3H irradiée léthalement. Huit jours après injection nous sacrifions les radiochimères et incubons les érythroblastes des colonies présentes sur la rate de la radiochimère (en admettant que les cellules souche de l'hybride donnent naissance à des colonies) ; nous vérifions alors la présence ou non de la chaîne α C57.

Si l'"opérateur" ou ce qui lui correspond dans les cellules eucaryotes gouvernant la transcription du gène α C57 présent sur le brin provenant de la souris C57 est différent de celui qui gouverne la transcription du gène α C57 présent sur le brin appartenant à la souris C3H, il est possible à ce moment d'observer la synthèse de la chaîne α C57. Le gène responsable de la synthèse de ce type de chaîne a été transcrit et traduit par les cellules érythroblastiques de l'hybride. Donc on peut penser que si l'ARN messager qui gouverne la synthèse de la chaîne α C57 chez les cellules érythroblastiques de la souris C3H était transcrit il serait traduit. Inversement, s'il n'est pas traduit c'est qu'il n'est pas transcrit.

Il ne faut pas cependant négliger la possibilité que l'"opérateur" soit le même ou qu'il puisse exister dans les cellules érythroblastiques de la souris hybride un facteur n'existant pas dans la cellule érythroblastique de la souris C3H, stabilisant le messager de la chaîne α C57 ou activant sa traduction.

D'après les résultats que nous avons présenté dans ce travail, c'est très peu probable. En effet ce ou ces facteurs existent chez la souris C3H adulte puisque nous avons constaté la synthèse de la chaîne α C57 dans les souris C3H adultes. C'est l'irradiation qui détruit ce facteur qui semble

présent dans le sérum de la souris C3H adulte non irradiée. Or l'environnement des cellules souche, qu'elles proviennent de la souris C3H ou de l'hybride, reste le même. C'est la souris C3H léthalement irradiée. Si l'arrêt de la synthèse de la chaîne α C57 était au niveau de la traduction de l'ARN messager, il devrait se produire aussi bien dans des radiochimères C3H ayant reçu des cellules souche de la souris hybride C3H/C57, que pour les radiochimères C3H ayant reçu des cellules souche de la souris C3H.

Si donc nous constatons la synthèse de la chaîne α C57 chez des radiochimères C3H ayant reçu des cellules souche de souris hybrides C3H/C57, il y aurait des raisons de penser que l'inactivation de la synthèse de la chaîne α C57 chez les radiochimères ayant reçu des cellules souche de souris C3H serait causée par l'arrêt de la transcription du gène qui gouverne la synthèse de cette chaîne.

Si au contraire nous ne constatons pas dans des radiochimères ayant reçu des cellules souche de la souris hybride, la synthèse de la chaîne α C57, nous ne pourrions pas déterminer à quel niveau de l'expression génique se situe le phénomène que nous avons mis en évidence. Nous aurions simplement confirmé sa validité.

L'éventualité selon laquelle le contrôle de la synthèse des chaînes d'hémoglobine aurait lieu au niveau de la traduction de l'ARN messager n'est pas, elle non plus, improbable. En effet FANTONI et al. (1969) ont montré sur l'embryon de souris, en utilisant l'actinomycine D, que les variations du taux de synthèse des hémoglobines embryonnaires présentes dans les érythroblastes issus des îlots sanguins, au cours de leur développement depuis le 10^{ème} jour jusqu'au 14^{ème} jour de gestation, pouvait être en grande partie sous le contrôle de facteurs gouvernant la synthèse protéique, et indépendants de la synthèse d'ARN messager, que celle-ci ait lieu ou n'ait pas lieu. Le contrôle de la synthèse de ces hémoglobines se situerait donc dans ce cas à un niveau post-transcriptionnel.

RESUME ET CONCLUSION

Dans ce travail nous avons en premier lieu étudié les hémoglobines de la souris de souche C3H au cours de son développement de l'état foetal à l'état adulte.

Dans les cellules érythroblastiques issues des cellules souche présentes dans les îlots sanguins, on distingue deux hémoglobines embryonnaires. Ce sont les hémoglobines E1 et E2. L'hémoglobine E2 est composée de quatre chaînes non- α qui semblent différentes des chaînes non- α de l'hémoglobine E1. Ces cellules érythroblastiques se développent chez le foetus depuis le 8ème jour jusqu'au 14ème jour de gestation. Le 13ème jour de gestation il n'y a plus synthèse d'hémoglobine E2 dans les cellules érythroblastiques, alors que l'hémoglobine E1 y est encore, activement synthétisée.

A partir du 13ème jour de gestation apparaissent dans la circulation sanguine du foetus des érythrocytes issus de cellules souche présentes dans le foie foetal. Dans ces érythrocytes on distingue deux hémoglobines, les hémoglobines A1 et A2 identiques à celles trouvées chez la souris C3H adulte. Nous n'avons pas trouvé d'hémoglobine de type foetal, du moins pas par les techniques chromatographiques utilisées.

Il semble aussi raisonnable de penser que les érythroblastes issus des îlots sanguins ne synthétisent que de l'hémoglobine de type embryonnaire et que les érythroblastes issus du foie foetal ne synthétisent que de l'hémoglobine adulte.

Les chaînes α des hémoglobines E1, A1 et A2 semblent être identiques entre elles, du moins dans la limite des méthodes utilisées (chromatographie des chaînes de globine, et carte peptidique de ces chaînes), alors que les chaînes non- α semblent toutes différer entre elles.

En réalité, chez la souris C3H adulte la chaîne α commune aux hémoglobines A1 et A2 est en réalité un mélange de deux chaînes α l'une identique à celle trouvée chez la souris de souche NB, et l'autre identique à celle trouvée chez la souris de souche C57. Nous les avons appelées pour les différencier α NB et α C57.

L'hétérogénéité de la chaîne α qui est présente chez la souris C3H adulte n'existe pas dans les érythroblastes issus du foie foetal le 13^{ème} jour de gestation. Seule la chaîne α de type α NB est synthétisée, du moins dans les limites de la méthode utilisée. La synthèse de la chaîne α C57 est active le 17^{ème} jour de gestation et proche le 18^{ème} jour de celle observée chez la souris C3H adulte.

Nous avons ensuite étudié la synthèse d'hémoglobine dans les radiochimères obtenues en irradiant léthalement des souris C3H adultes et en leur injectant par piqûre intraveineuse des cellules souche provenant d'une souris C3H adulte non irradiée.

Nous avons constaté alors que la chaîne α d'hémoglobine synthétisée par les érythroblastes issus des cellules souche injectées à ces souris C3H léthalement irradiées, ne présentait pas l'hétérogénéité constatée chez les érythroblastes présents chez la souris C3H adulte non irradiée. Chez les radiochimères, seule la chaîne α de type NB est synthétisée.

Si tous les jours pendant 8 jours on injecte à ces radiochimères du sérum provenant de souris adultes non irradiées, on constate l'activation de la synthèse de la chaîne α C57. Si par contre on injecte à ces radiochimères tous les jours pendant 8 jours du sérum provenant de souris C3H léthalement irradiées, nous n'observons aucune activation de la synthèse de la chaîne de type α C57.

Ces résultats qui sont les plus intéressants de ce travail, nous ont permis d'émettre l'hypothèse qu'il existait dans le sérum un ou plusieurs facteurs capables, directement ou indirectement, d'activer la synthèse de la chaîne α d'hémoglobine de type α C57. Ce facteur disparaîtrait après irradiation de la souris C3H adulte.

La synthèse de la chaîne d'hémoglobine α C57, qu'elle soit réglée au niveau de la traduction ou de la transcription, ou bien aux deux niveaux, est sous la dépendance d'un (ou de plusieurs) facteurs diffusibles. Elle n'est pas

déterminée intrinsèquement et irréversiblement par la situation dans la cellule souche et dans ses descendants érythroblastiques. Le milieu dans lequel se développe l'érythron intervient dans cette détermination.

Le facteur responsable de la détermination est transporté par le sérum de souris adulte normale. Le travail présenté ici ne permet pas de déterminer à partir de quel stade cellulaire de la "série rouge" l'activation ou l'inactivation de la synthèse de la chaîne α C57 devient irréversible.

Le long d'une lignée cellulaire, une détermination irréversible de la synthèse ou de l'absence de synthèse d'une protéine donnée se fait tôt ou tard. Ce que ces résultats permettent de dire, c'est que cette détermination irréversible n'a pas encore eu lieu au niveau de la cellule souche érythropoïétique en ce qui concerne la synthèse des chaînes d'hémoglobine.

Il est évident que le facteur présent dans le sérum n'intervient pas dans la détermination de la cellule souche érythropoïétique en tant que telle, ni dans la détermination comme cellule souche de la série érythropoïétique. En effet, en l'absence de chaîne α type α C57, d'autres chaînes d'hémoglobine sont synthétisées. Nos résultats confirment donc l'idée selon laquelle la différenciation cellulaire se produirait au moins à deux niveaux dont l'un serait relatif à certains groupes de gènes, et l'autre à l'expression de tel ou tel gène individuel, ou de tel sous-groupe de gènes. Le premier type de détermination serait le fait primaire de la destinée cellulaire. Il reste à savoir dans quelle mesure il peut être réversible. Le second type de détermination jouera à la suite du premier. Nous avons montré qu'il était réversible.

Rien ne prouve que la distinction entre détermination du type cellulaire et la détermination secondaire opérant dans ce complexe, recouvre la distinction entre les déterminations à la transcription et à la traduction. La distinction que nous suggérons pourrait se rapporter à la transcription seule.

Une détermination à la traduction pourrait s'y surajouter. La détermination "primaire" de la différenciation cellulaire pourrait être celle opérée par les protéines associées avec l'ADN, la détermination de l'expression de gène individuel étant sous le contrôle d'un autre mécanisme, soit à la transcription soit à la traduction, ou aux deux niveaux. C'est à ce dernier niveau qu'a porté notre travail, centré sur l'expression d'un gène individuel.

REFERENCES

- ANDERSON D., R.E. BILLINGHAM, G.H. LAMPKIN et P.B. MEDAWAR (1951), Heredity Lond. 5, 379.
- ANSON M.L., A.E. MIRSKY (1930), J. General Physiol., 13, 469.- 476
- BARKER D.E.O. (1968), Developmental Biology, 18, 14.
- BESSIS M. (1972), Cellules du Sang, Masson ed., Paris.
- BORGHESE E. (1969), Acta Anal., 36, 185.
- BRECHER, G., W.W. SMITH, S. WILSON et S. FRED (1967), Rad. Res. 30, 600.- 610.
- CARPENTER F. H. (1967) Methods in Enzymology, 11, Hirs CHW ed., p. 237
- CLEGG M.B., M.A. NAUGHTON et D.J. WHEATHERALL (1969), Nature, 207, 945-947.
- DAN M., A. HAGIWARA (1967), Exp. Cell. Res., 46, 596-598
- EVANS M.J. et LINGREL J.B. (1969), Biochemistry, 8, 3000.- 3005
- FANTONI A., A. de la CHAPELLE, D. CHUI, R.A. RIFKIND, et P.A. MARKS (1969), Ann. N.Y. Acad. Sc., 165, 194.- 204
- GABUZDA G., R. SILVER (1970), Brit. J. Hematol., 19, 621-633.
- GIKMAN J.G., SMITHIES O., GIBSON D.M., FANING E.M. (1970), cité dans "Atlas of Protein Sequence and Structure", vol. 5 (1972).
- HALL J.G., A.G. MOTULSKY (1968), Nature, 217, 569-571.
- HILL et L.C. GRAIG (1959), J. Am. Chem Soc., 81, 2272.- 2273
- HILSE K., R.A. POPP (1968), Proc. Natl. Acad. Sc., 61, 930-936.
- HUEHNS E.R., N. DANCE, G.H. BEAUEN, F. HECHT, et A.G. MOTULSKY, (1964) Nature, 201, 1095.- 1097
- HUISMAN T.H.J., J.B. WILSON, H.R. ADAMS (1967), Arch. Biochem. Biophys. 121 528. - 532

- JONES R.T. (1964), Cold Spring Harbor Quant. Biol., 29, 297-308.
- KILMARTIN J.V., J.B. CLEGG (1967), Nature, 213, 269. - 271.
- KING T.P., L.C. CRAIG (1955), Advances in Protein Chemistry, 10, 210-228.
- KNOLL W. (1949), Acta Haematol, 2, 369-377.
- KOWACHS J.S., P.A. MARKS, E.S. RUSSELL, H. EPLER (1967), J. Mol. Biol., 25, 131. - 142
- LANE C.D., G. MARBAIX et J.B. GURDON (1971), J. Mol. Biol., 61, 73-91.
- LEBEAU A., B. ROSA (1972), Communication personnelle.
- MARKS P.A., J.S. KOWACHS (1966), Current Topics in Develop. Biol., ed. Monroy & Moscana, vol. 1, Academic Press, 213-252.
- MARKS P.A., A. FANTONI, A. de la CHAPELLE (1968), Vitamins & Hormones, 26 331-335.
- MATIOLI G. et E. EYLAR (1964), Proc. Nat. Acad. Sc., 52, 508. - 516.
- MOAR V.A., J.B. GURDON et C.D. LANE (1971), J. Mol. Biol., 61, 93-103.
- NIEWISCH H., HAJDIK I., SULTANIAN I., VOGEL H. et MATIOLI G. (1970), J. Cell. Physiol., 76, 107-115
- NIEWISCH H., H. VOGEL, G. MATIOLI (1967), Proc. Natl. Acad. Sc., 58, 2261-2267.
- RHINESMITH H., H. HUI-CHIU-LI, B.L. MILLIKIN, L.C. STRONG (1964), Analytical Biochem., 8, 407-414.
- RIGGS A. (1965), Science 147, 621-623.
- RUGH R. (1968), The Mouse, its Reproduction and Development, Burgess Publ. Co., Minneapolis, Minn., USA.
- SALLEI J.P., E. ZUCKERKANDL, A. DUPUY d'ANGEAC - Résultats non publiés.
- SCHROEDER W.A., B. ROBERSON (1962), Anal. Chem., 37, 1583.
- SCHROEDER W.A., T.H.J. HUISMAN, J.R. SHELTON, D.B. SHELTON (1968), Proc. Natl. Acad. Sc., 60, 537-544.
- SCHROEDER W.A., J.B. SHELTON et J.R. SHELTON (1969), Arch. Biochem. Biophys. 130, 551-556.

- SCHAPIRA G., J.C. DREYFUS et N. MALEKNIA (1968), Biochem. Biophys. Res. Comm. 32, 558-561.
- SICK K., D. BEALE, D. IRVINE, A. LEHMANN, P.T. GOODALL et Mc DOUGALL S. (1967), Biochim. Biophys. Acta, 140, 231. - 242.
- SPAKMANN W.H., S. MOORE, W STEIN (1958), Anal. Chemistry, 30, 1190.
- STEINER R. (1972), Thèse : Technische Universität, Munich.
- STEINER R. (1973), communication personnelle.
- TILL J.E. et E.A. Mc CULLOCH (1961), Rad. Res., 14, 213.
- VAN BEKKUM D.W., M.J. VAN NOORD, B. MAAT, K.A. Dicke (1971), Blood, 38, 547-548.
- VOGEL H., NIEWISCHH., G. MATIOLI (1969), J. Theoret. Biol. 22, 249-270.
- VOGEL H., I. HAJDIK, H. NIEWISCH, I. SULTANIAN et G. MATIOLI (1970) J. Cell. Physiol., 76, 117-126.
- Von EHRENSTEIN G. (1966), Cold Spring Harbor Quant. Biol., 31, 705-714.
- WASSERMANN (1972), Molecular Control of Cell Differentiation and Morphogenesis, Marcel Dekker Inc., New York.
- WILLIAMSON, DREWENKIEWICZ et PAUL (1973), Nature New Biol., 241, 66-68
- WOOD W.G., J.H. WHITTAKER, J.B. CLEGG et D.J. WEATHERALL (1972) Biochim. Biophys. Acta, 277, 413-420.
- WU A.M., L. SIMINOVICH, J.E. TILL et E.A. Mc CULLOCH (1968), Proc. Natl. Acad. Sc., 59, 1209. - 1215.

